

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE
TOULOUSE III**

Spécialité :

Immunologie, Signalisation, Tumeurs Lymphoïdes

Par

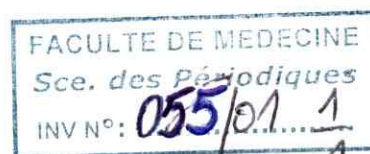
BOUCHAIB BAHBOUHI

Le 23 Octobre 2001

**Etude de la maturation du précurseur des glycoprotéines
d'enveloppe (gp160) du virus de l'immunodéficience humaine
(VIH) : Développement d'inhibiteurs protéiques et
peptidiques, et caractérisation biochimique des enzymes
impliquées**

Dirigée par :

Pr. ELMOSTAFA BAHRAOUI



Jury

Pr. ALAIN BLANCHARD	Rapporteur
Dr. CLAUDE GRANIER	Rapporteur
Dr. GÉRARD LOISON	Examineur
Pr. ELMOSTAFA BAHRAOUI	Directeur de thèse
Pr. JACQUES PÉRIÉ	Examineur
Dr. JUSTIN TEISSIÉ	Président

CHAPITRE I : Rappels bibliographiques

[Première partie]- Les rétrovirus (Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH)).

A- Définition	.p 14
A-1- Les virus	.p 14
A-2- Les rétrovirus	.p 14
A-3- Classification des rétrovirus	.p 17
B- Organisation du génome rétroviral	.p 17
B-1- Introduction	.p 17
B-2- Les régions non-codantes	.p 17
B-3- Les régions codantes	.p 18
C- Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1	.p 20
C-1- Introduction	.p 20
C-2- Les régions non-codantes du VIH-1	.p 21
C-3- Les régions codantes du VIH-1	.p 21
C-3-1- Les protéines structurales	.p 21
C-3-2- Les protéines régulatrices ou auxiliaires	.p 26
C-4- Cycle de réplication du VIH-1	.p 35
C-5- Variabilité génétique du VIH-1	.p 40
C-6- Cellules cibles du VIH-1	.p 42
C-7- Manifestations cliniques de l'infection VIH-1	.p 43
D- Le virus de l'immunodéficience humaine acquise de type 2	.p 45

[Deuxième partie]- Les facteurs de l'hôte et leur rôle dans l'évolution de l'infection par le VIH-1.

A- Introduction	.p 47
B- La réplication virale et les facteurs de l'activation immunitaire	.p 48
C- La réplication virale et les cytokines	.p 49
D- Les co-récepteurs du VIH-1 et le tropisme cellulaire	.p 50
E- Les co-récepteurs et la résistance à l'infection	.p 52
F- La progression de l'infection VIH-1	.p 54

[Troisième partie]- La gp160 du VIH-1 : transport et clivage en gp120 et gp41

A- Introduction	.p 55
B- Importance du clivage des précurseurs des glycoprotéines de l'enveloppe dans le pouvoir infectieux viral	.p 58
C- Les propriétés de la gp160 du VIH-1	.p 63
D- Le clivage de la gp160 en gp120 et gp41	.p 67
D-1- Les prohormones convertases (PCs)	.p 67
D-1-1- Introduction	.p 67
D-1-2- Découverte des prohormones convertases	.p 68
D-1-3- Les substrats des prohormones convertases	.p 70
D-1-4- Caractérisation moléculaire des prohormones convertases	.p 72
D-1-5- Isoformes des prohormones convertases	.p 73
D-1-6- Activation auto-catalytique des prohormones convertases	.p 74
D-1-7- Distribution cellulaire et tissulaire des prohormones convertases	.p 74
D-1-8 Capacité des prohormones convertases à cliver la gp160 en gp120 et gp41	.p 75
D-2- Les enzymes Ca ²⁺ -indépendantes	.p 77
D-3- Autres activités enzymatiques	.p 78

[Quatrième partie]- Inhibition du clivage de la gp160 en gp120 et gp41 : inhibiteurs des sérine-protéases.

A- Les inhibiteurs protéiques des sérine-protéases (serpins)	.p 82
A-1- Introduction	.p 82
A-2- Mode d'action	.p 85
A-3- Données cristallographiques sur la structure des serpins	.p 86
A-4- Serpins artificielles	.p 89
B- Les inhibiteurs peptidiques des sérine-protéases	.p 92
B-1- Propriétés	.p 92
B-2- Inhibition par des peptides du clivage de la gp160 en gp120 et gp41	.p 94

CHAPITRE II : Objectifs de la thèse

Objectifs expérimentaux

.p 96

CHAPITRE III : Partie expérimentale

Liste des publications

.p 97

Résumé de l'article 1

.p 99

Article 1: Effect of $\alpha 1$ -antitrypsin Portland variant ($\alpha 1$ -PDX) on HIV-1 replication

.p 106

Résumé de l'article 2

.p 114

Article 2: Inhibition of HIV-2_{ROD} replication in a lymphoblastoid cell line by the $\alpha 1$ -antitrypsin Portland variant ($\alpha 1$ -PDX) and decRVKRcmk peptide: comparison to HIV-1_{LAI}

.p 119

Résumé de l'article 3

.p 143

Article 3: Replication of HIV-1 viruses in the presence of the $\alpha 1$ -antitrypsin Portland variant ($\alpha 1$ -PDX): Direct correlation to an enhanced processing of the $\alpha 1$ -PDX inhibitory form.

.p 145

Résumé de l'article 4

.p 164

Article 4: Effect of L- and D-REKR aminoacids containing peptides on HIV and SIV envelope glycoprotein precursor maturation and viral replication

.p 170

Résumé de l'article 5

.p 196

Article 5: Purification and characterization of a Ca^{2+} -independent endoprotease activity from peripheral blood lymphocytes: involvement in HIV-1 gp160 processing.

.p 199

CHAPITRE IV : Conclusion de la thèse

Conclusion et perspectives

.p 210

CHAPITRE V : références bibliographiques

Références bibliographiques

.p 217

Résumé

Le clivage du précurseur des glycoprotéines d'enveloppe gp160 (*Env*) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou simienne (VIS) en gp120 (SU) et gp41 (TM) est une étape clef du cycle viral. Tout blocage de cette étape conduit à des virus qui ne sont plus infectieux. Ce clivage est catalysé par des endoprotéases de la cellule hôte, et il a lieu au niveau d'un site conservé entre la majorité des virus enveloppés, et de séquence consensus R-X-R/K-R. L'objectif de ce travail est de tester et développer des inhibiteurs spécifiques de cette étape et de caractériser les endoprotéases cellulaires responsables de cette maturation. Deux types d'inhibiteurs ont été testés : i) protéiques qui sont dérivés d'inhibiteurs naturels plasmatiques des sérine-protéases comme l' α 1-antitrypsine en introduisant par mutagenèse dirigée dans leurs sites actifs, la séquence de clivage de la gp160 (RXKR); ii) peptidiques dont les séquences sont dérivées de la région de la gp160 aux alentours du site de la maturation (REKR). Dans l'approche des inhibiteurs protéiques, nous avons évalué le rôle du variant de Portland de l' α 1-antitrypsine (α 1-PDX) qui a été obtenu par mutagenèse dirigée en greffant la séquence RXXR dans le site actif de l' α 1-antitrypsine, à interférer avec la réplication virale du VIH-1 et VIH-2, l'induction des syncytia, et avec la maturation de la glycoprotéine d'enveloppe *Env* en SU (gp120 pour VIH-1, et gp125 pour VIH-2) et TM (gp41 pour VIH-1, et gp36 pour VIH-2). Dans cet objectif, des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire CD4+) stablement transfectées par le plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc de l' α 1-PDX ont été infectées par le VIH-1 et/ou VIH-2. Comme contrôle, des cellules Jurkat ont été transfectées dans les mêmes conditions par le plasmide pcDNA3 seul. Les résultats obtenus montrent que l' α 1-PDX bloque fortement, mais non totalement, la réplication virale et l'induction de la formation des syncytia en interférant avec la maturation de la gp160 en gp120 et gp41. Des résultats similaires ont été obtenus avec le VIH-2. Contrairement aux virus produits en présence de l' α 1-PDX durant les deux premières semaines, l'analyse des virus produits après trois semaines, montre qu'ils retrouvent leur pouvoir infectieux. Le séquençage de la région contenant le site du clivage de la gp160 montre que cet échappement n'est pas dû à des mutations du gène *env*. Par contre, cet échappement viral semble être associé à une forte protéolyse de l' α 1-PDX. Le mécanisme moléculaire responsable de cette dégradation au cours de l'infection VIH-1 reste à déterminer. Dans la deuxième approche, nous avons ciblé l'inhibition de la maturation de la gp160 à l'aide de peptides synthétiques contenant la séquence consensus R-X-K/R-R du site potentiel du clivage de la gp160, qui ont été associés du côté N-terminal à un groupement décanoyl (dec) pour faciliter leur passage de la barrière membranaire, et du côté C-terminal à un groupement chlorométhylcétone (cmk) permettant l'établissement, après la formation du complexe enzyme-inhibiteur, d'une liaison covalente irréversible qui fait de ces peptides, des inhibiteurs suicides. Ainsi, nous avons testé la capacité des peptides decRVKRCmk, dec14D (TKAKRRVVEREKRV) et dec14Dcmk à bloquer la réplication virale des VIH et/ou celle du VIS. Nos résultats montrent que ces peptides inhibent la réplication des virus VIH-1, VIH-2 et VIS par un mécanisme qui semble similaire à celui que nous avons décrit pour l' α 1-PDX. La caractérisation enzymatique de ces substrats, montre que le peptide dec14D n'est dégradé ni par la furine ni par la PC7 (sérine-endoprotéases de la famille des prohormones convertases). De plus, ce peptide semble mieux inhiber la PC7 ($K_i = 4,5 \mu\text{M}$) que la furine ($K_i > 150 \mu\text{M}$). Nous avons donc utilisé cette spécificité du peptide dec14D d'être reconnu par les endoprotéases cellulaires sans être dégradé, en chromatographie d'affinité pour purifier à partir des lymphocytes du sang périphérique (cellules cibles du VIH-1) les endoprotéases impliquées dans la maturation du précurseur *Env*. Après trois étapes de purifications supplémentaires incluant des filtrations moléculaires et chromatographies d'affinité sur ions Zn^{++} , nous avons purifié un hétéro-dimère composé de trois sous-unités de 66, 32 et 24 kDa, qui est capable de cliver correctement la gp160 en gp120 et gp41 en absence totale du calcium. La caractérisation à l'aide d'inhibiteurs enzymatiques montre qu'il s'agit d'une sérine-endoprotéase ayant un pH optimum entre 6,5 et 7. Cette contribution supporte l'hypothèse que la maturation de la gp160 du VIH-1 impliquerait au moins deux familles d'endoprotéases en fonction de la dépendance du calcium.