

Récents développements de la pharmacologie anti-VIH

Jean-François Mouscadet et Éric Deprez

Abstract

Recent advances in anti-HIV pharmacology

Compounds that are currently licensed for the treatment of human immunodeficiency virus infections are either reverse transcriptase (RT) or protease (PR) inhibitors. In spite of the dramatic efficiency of therapies associating several of such compounds, new antiretrovirals are needed to thwart the rapid emergence of antiviral resistance. RT and PR inhibitors belonging to new structural classes that possess activity against viral strains, resistant to the first generation drugs, are currently developed. Regarding new targets, considerable progress has been made in the understanding of the viral integrase, enabling the design of agents that can inhibit the viral DNA integration step. In addition to viral enzymes, the process of HIV cell entry has been recently deciphered. New promising agents impairing cell recognition, co-receptor binding or viral-cell fusion have now entered clinical trials.

Mots-clés

Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), intégrase, protéase, transcriptase inverse, fusion.

Key-words

Human immunodeficiency virus (HIV), integrase, protease, reverse transcriptase, fusion.

En 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) créait la division de *Surveillance et contrôle des maladies émergentes et autres maladies transmissibles*. Cette création était motivée par les apparitions répétées de ce que l'on nomme des maladies émergentes dont la plupart sont dues à des virus. Ceux-ci, identifiés grâce aux progrès du diagnostic, ne sont pas nouveaux au sens strict mais sont qualifiés d'émergents du fait de leur extension récente. Ces virus

apparaissent du fait de mutations ou de recombinaisons entre des virus existants et/ou parce que les conditions dans lesquelles ils subsistaient ont été modifiées. L'expansion de la population mondiale et de ses activités qui favorisent les contacts entre les animaux porteurs de virus pathogènes et les humains ainsi que la transmission d'homme à homme est particulièrement en cause. C'est le cas notamment pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui résulterait de l'entrée dans l'espèce humaine, au cours de la première moitié du XX^e siècle, de virus de singes [1-3]. Les problèmes posés en santé publique par le VIH-1 comme par les autres virus émergents sont à l'origine d'un fort regain d'intérêt pour la pharmacologie antivirale. Au début des années 1980, seulement cinq composés étaient commercialisés comme antiviraux. Vingt ans plus tard, une trentaine de produits sont présents dans la pharmacopée humaine dont quinze sont utilisés comme anti-VIH (voir *tableau I*). Les polythérapies combinant deux ou trois de ces antiviraux avec une remarquable efficacité sont devenues le traitement standard du sida [4-5].

Glossaire

Cytoplasme

Espace interne de la cellule, limité par la membrane cellulaire, à l'exclusion du noyau.

Essais cliniques

Ensemble des essais thérapeutiques d'un produit administré à l'Homme. Phase I : étude de tolérance du produit ; phase II : étude des propriétés pharmacodynamiques et collecte des premières données sur l'effet thérapeutique ; phase III : appréciation des effets thérapeutiques et des effets indésirables ; phase IV : essai tardif destiné à affiner les connaissances sur le médicament et à en préciser les modalités et conditions d'utilisation.

Génome

Ensemble des gènes d'un organisme particulier.

Intégrase

Enzyme virale codée par l'extrémité C-terminale du gène *pol*, responsable de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule infectée.

Protéase

Enzyme virale codée par l'extrémité N-terminale du gène *pol*, responsable du clivage des précurseurs polyprotéiques en protéines fonctionnelles.

RnaseH

Activité enzymatique qui dégrade l'ARN des duplex ADN/ARN. Elle est portée par le domaine C-terminal de la transcriptase inverse et est nécessaire pour la transcription inverse de l'ARN en ADN.

Transcriptase inverse

Enzyme virale codée par la partie centrale du gène *pol* qui catalyse la transcription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin à partir duquel les gènes viraux s'expriment.

Tableau I - Inhibiteurs du VIH commercialisés.

Analogues de nucléosides (INTI)	AZT (zidovudine) ddI (didanosine) ddC (zalcitabine) d4T (stavudine) 3TC (lamivudine) ABC (abacavir)
Analogue nucléotidique	ténofovir
Analogues non nucléosidiques (INNTI)	nevirapine delavirdine efavirenz
Inhibiteurs de protéase (IP)	amprenavir indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir

Les virus sont des parasites intracellulaires stricts dont le génome est de taille limitée, de l'ordre de 10 kilobases pour le VIH. La plupart utilisant la machinerie cellulaire pour assurer leur réplication, la conception d'antiviraux peut donc tirer profit soit de cibles strictement virales, soit de cibles cellulaires. La première approche est la plus susceptible de fournir des inhibiteurs spécifiques et peu toxiques, mais avec une probabilité importante d'émergence de virus résistants. La seconde approche pourrait permettre d'identifier des composés à large spectre avec une probabilité moindre de voir apparaître des résistances. Toutefois, le risque de toxicité y est plus important. En pratique, la première approche est celle qui a donné le plus de résultats. Jusqu'à présent, elle a été essentiellement consacrée à la recherche d'inhibiteurs des enzymes virales pour lesquelles il est plus aisé d'obtenir des tests d'activité simples, adaptés au criblage des grandes chimiothèques. Dans le cas du VIH, la réplication du virus dépend de trois enzymes virales qui constituent le moteur moléculaire de la réplication du virus (figure 1) : la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. Une quatrième activité enzymatique, l'activité RNaseH, qui est une activité nucléasique dégradant l'ARN, est portée par un domaine de la transcriptase inverse. Ces activités enzymatiques sont donc les cibles privilégiées de la pharmacologie. Les inhibiteurs de transcriptase inverse ont été découverts très tôt, à partir d'inhibiteurs connus de polymérase. Le premier d'entre eux, l'azidothymidine (AZT), a été utilisé dès 1986. Par la suite, la résolution de la structure de la protéase virale a permis la conception rationnelle d'inhibiteurs basés sur des analogues de substrat non clivables. Les polythérapies actuelles utilisent des combinaisons d'antirétroviraux (ARV) dirigés contre ces deux cibles. Toutefois, quels que soient les régimes médicamenteux, on observe à plus ou moins brève échéance l'apparition de virus résistants aux ARV.

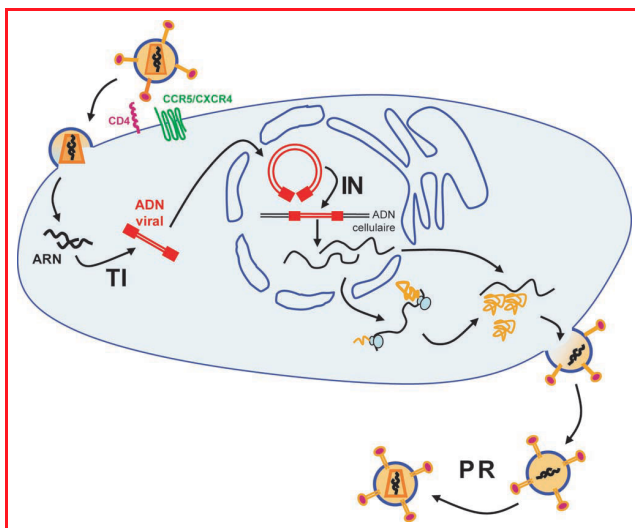


Figure 1 - Cycle de réplication du VIH.

Le cycle rétroviral présente plusieurs étapes qui sont les cibles des antirétroviraux actuels. Après l'adsorption du virus sur la membrane cellulaire par fixation sur le CD4 et l'un des deux co-récepteurs (CCR5/CXCR4), le virus pénètre dans la cellule par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Le génome viral sous forme de deux molécules d'ARN est transcrit par la transcriptase inverse (TI) en ADN. Celui-ci migre dans le noyau où il est intégré définitivement dans l'ADN cellulaire par l'intégrase virale (IN). Après la transcription et la traduction, les ARN viraux et les protéines viraux s'assemblent pour former une particule virale qui bourgeonne à la membrane cellulaire. Ces particules deviennent infectieuses après maturation par la protéase virale (PR) qui clive les précurseurs polyprotéiques en protéines structurales et en enzymes.

Abréviations

ARV : antirétroviral.
IN : intégrase.
INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse.
INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse.
IP : inhibiteur de la protéase.
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
PR : protéase.
RnaseH : ribonucléase H.
Sida : syndrome de l'immunodéficience humaine acquise.
TI : transcriptase inverse.
VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

La résistance est liée à la présence de mutations dans la séquence du virus qui modifie la structure de l'une ou des deux enzymes ciblées. Ces mutations sont générées par le mode de réplication du virus qui utilise une polymérase, la transcriptase inverse, dénuée d'activité de relecture. Les mutations, constamment produites, émergent sous la pression de sélection imposée par la présence de l'inhibiteur. Les ARV deviennent alors moins actifs car les mutations sélectionnées se traduisent par une perte d'affinité du produit pour sa cible. La résistance aux ARV est devenue un problème majeur du traitement de l'infection par le VIH. Bien que des dizaines de milliers de composés à activité anti-VIH aient été identifiés (voir http://apps1.niaid.nih.gov/struct_search/ pour une liste exhaustive), les progrès les plus significatifs portent sur l'obtention de composés actifs contre les isolats viraux résistants et/ou dirigés contre de nouvelles cibles. Ce sont ces progrès que nous détaillons ci-après.

Nouveaux inhibiteurs de transcriptase inverse

Le génome du virus qui pénètre dans la cellule est constitué de deux molécules d'ARN simple brin. Pour que le virus puisse se répliquer, cet ARN doit être transcrit en ADN double brin (figure 1). Cette étape est catalysée par la transcriptase inverse virale (TI) dont les nucléotides cellulaires sont les substrats endogènes. Les inhibiteurs de TI sont classés en deux catégories selon leur mécanisme d'action.

La première catégorie comprend les analogues de nucléosides (inhibiteurs nucléosidiques ou INTI) qui rentrent en compétition avec les substrats naturels de l'enzyme. Ces composés doivent être triphosphorylés en nucléotides pour pouvoir agir. La première phosphorylation, prise en charge par une kinase cellulaire, est l'étape limitante de leur activité antivirale. Du point de vue virologique, ces inhibiteurs génèrent tous l'apparition de résistances. Les différents produits sélectionnent des mutations différentes, mais celles-ci induisent souvent des résistances croisées [6]. Les principaux enjeux actuels sont l'obtention d'analogues actifs contre les virus résistants aux produits actuels et la synthèse d'analogues de nucléosides monophosphorylés de façon à contourner la première étape de phosphorylation. Citons pour l'exemple deux analogues particulièrement avancés : l'emtricitabine ou FTC (**1**), un analogue de la cytosine, et l'amdoxovir ou DAPD (**2**), un analogue de la guanosine (figure 2). L'intérêt de ce dernier réside dans sa capacité à bloquer la réplication des virus portant la mutation dite d'insertion à la position 69 de la TI, mutation associée à une large résistance aux autres INTI. Concernant les analogues

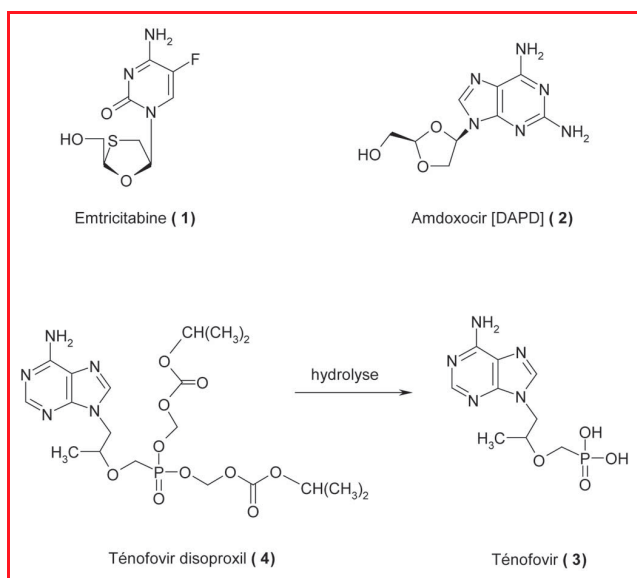


Figure 2 - Nouveaux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.

L'emtricitabine et l'amdoxovir sont deux analogues de nucléosides dont l'activité antivirale dépend d'une triphosphorylation en nucléotides. L'amdoxovir est une prodrogue, désaminée *in vivo* en DXG (dioxolane guanine) par une adénine désaminase cellulaire. Le ténofovir est une nucléotide monophosphorylée dont la prodrogue active est le ténofovir disoproxil.

phosphorylés, le ténofovir (3), récemment commercialisé, est actuellement l'unique produit dans cette catégorie. C'est un analogue monophosphorylé qui ne requiert donc que deux étapes cellulaires de phosphorylation. Le ténofovir illustre également une autre voie de recherche sur les ARV puisque le produit lui-même n'ayant pas été utilisé du fait de sa très faible biodisponibilité, il est commercialisé sous forme de prodrogue, le ténofovir disoproxil (4), un précurseur hydrolysable. Le ténofovir est également intéressant du point de vue des résistances puisque la mutation M184V, qui est très rapidement sélectionnée sous lamivudine (3TC), confère une hyper-susceptibilité au ténofovir. En contrepartie, la seule mutation majeure associée au ténofovir à ce jour, la mutation K65R, présente un profil de résistance croisée avec l'abacavir, l'amdoxovir, la didanosine, la lamivudine et la zalcitabine.

La seconde catégorie comprend des composés qui se fixent à l'enzyme sur un site différent de celui du substrat (inhibiteurs non nucléosidiques ou INNTI). Dans cette catégorie, une trentaine de classes chimiques différentes ont été identifiées dont trois produits seulement sont actuellement commercialisés (nevirapine, delavirdine et efavirenz). Les INNTI induisent l'émergence de résistances en quelques semaines. L'apparition de mutations est ralentie par l'utilisation de doses élevées et la combinaison avec des INTI. Une seconde génération d'INNTI est actuellement en développement. Deux produits sont particulièrement avancés : le DPC083 (5) et le TMC125 (6) qui sont actifs à des concentrations nanomolaires non seulement contre la transcriptase sauvage, mais également contre un certain nombre de mutants résistants aux autres INNTI (figure 3). Plus encore, la résistance au DPC083 nécessite la combinaison de plusieurs mutations, ce qui n'est pas le cas des autres INNTI [7]. Ces deux produits ont montré une activité remarquable dans les essais de phase II et sont actuellement en essais cliniques avancés.

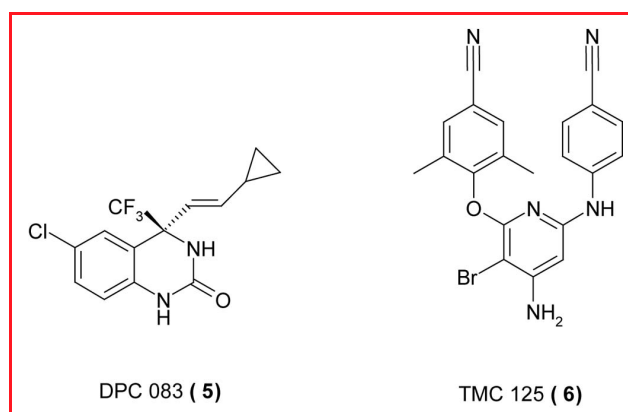


Figure 3 - Nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

DPC083 et TMC125 sont deux exemples de nouveaux dérivés qui inhibent la transcriptase inverse selon un mode non compétitif. Ils sont tous deux actifs contre des isolats viraux résistants aux mutants sélectionnés par les INNTI actuels.

Nouveaux inhibiteurs de protéase

Les protéines de structures et les enzymes du VIH sont produites à partir des gènes viraux sous forme de précurseurs polyprotéiques. La formation de nouveaux virus infectieux nécessite le clivage de ces précurseurs en entités fonctionnelles. Cette maturation, réalisée par la protéase virale, est bloquée par les inhibiteurs de celle-ci (IP). Tous les IP actuellement utilisés sont des peptido-mimétiques du substrat de la protéase qui contiennent une liaison hydroxyéthylène à la place d'une liaison peptidique et qui sont par conséquent non clivables. L'atazanavir (7), un peptido-mimétique approuvé par la FDA en juin 2003 (sous le nom de Reyataz) constitue le développement le plus récent de ce type de composé (figure 4). Cet inhibiteur reste efficace contre certaines mutations associées à la résistance aux autres IP. Par ailleurs, comme l'utilisation de peptido-mimétiques conduit systématiquement à l'apparition de résistances croisées, la recherche d'inhibiteurs non peptidiques est devenue un objectif majeur. De ce point de vue, un premier composé, le tripanavir (8), a démontré une excellente efficacité contre des isolats viraux isolés de patients résistants aux IP. D'autres inhibiteurs non

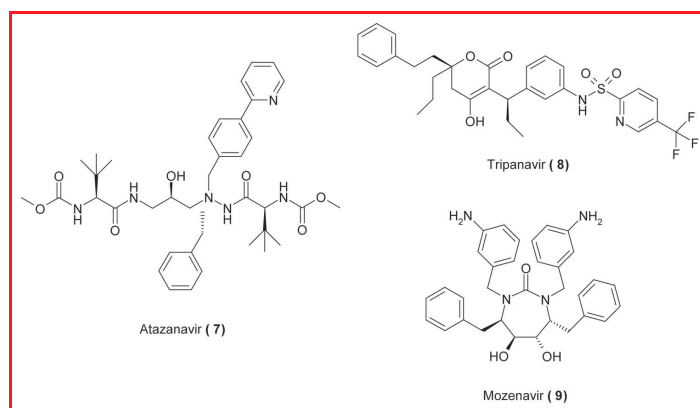


Figure 4 - Nouveaux inhibiteurs de la protéase virale.

L'atazanavir est le peptido-mimétique le plus récent capable de bloquer l'activité de la protéase virale. Le tripanavir et le mozenavir sont les deux premiers IP non peptido-mimétiques à présenter un intérêt clinique potentiel.

peptidiques aux propriétés semblables comme le mozenavir (9) ont également montré une activité intéressante en essai de phase I/II et sont en cours d'évaluation. Ces inhibiteurs non peptidiques offriraient de surcroît une meilleure biodisponibilité orale.

Inhibiteurs de l'intégrase virale

Conception des inhibiteurs

Contrairement à la transcriptase inverse et à la protéase, aucun inhibiteur d'intégrase (IN) n'est disponible dans la pharmacopée actuelle. A la différence des deux premières qui ont bénéficié de travaux antérieurs sur des enzymes homologues, l'intégrase n'a pas d'équivalent cellulaire ayant fait l'objet d'une recherche pharmacologique antérieure. Cette enzyme, strictement indispensable à la réplication du virus, s'est donc présentée au début des années 90 comme un nouveau défi. L'intégrase est l'enzyme qui catalyse l'insertion covalente du génome viral dans le génome hôte (figure 5) (voir [8] pour une bibliographie exhaustive concernant les mécanismes de l'intégration). Ce processus qui suit l'étape de transcription inverse et précède l'expression des gènes viraux comprend deux réactions distinctes qui sont toutes les deux des trans-estérifications. Dans un premier temps, l'intégrase se fixe spécifiquement sur deux séquences courtes situées aux deux extrémités de l'ADN viral et catalyse une maturation endonucléolytique des extrémités 3'-OH de l'ADN viral (ou « 3'-processing ») qui se traduit par l'élimination d'un dinucléotide à chaque extrémité. Cet ADN clivé sert ensuite de substrat pour l'intégration *sensu stricto* ou transfert de brins qui conduit à l'insertion covalente de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. *In vivo*, les deux réactions sont spatialement et temporellement séparées puisque la maturation des extrémités a lieu dans le cytoplasme tandis que le transfert de brins est évidemment nucléaire. L'intégrase est constituée de trois domaines structuraux indépendants. Parmi ceux-ci, le domaine central ou cœur catalytique porte la triade D,D(35)E d'acides aminés, responsable de la catalyse. La protéine présente des flexibilités inter-domaines importantes, ce qui a jusqu'à présent empêché l'obtention

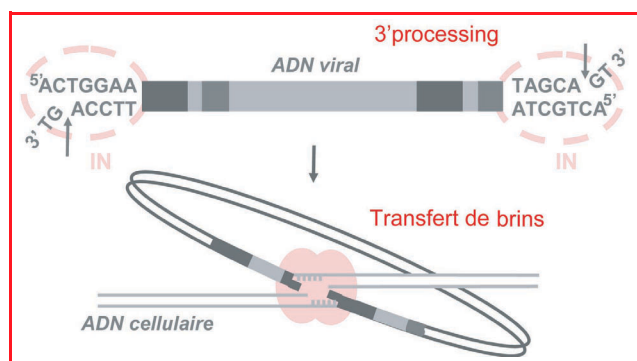


Figure 5 - Mécanisme d'action de l'intégrase virale.

Après la transcription inverse, l'intégrase virale se fixe à chaque extrémité de l'ADN du VIH linéaire. Elle libère un dinucléotide GT en catalysant une attaque nucléophile de la liaison phosphodiester en aval d'un dinucléotide 5'CA très conservé. La nucléoprotéine migre dans le noyau où l'intégrase catalyse une réaction de transfert de brins entre les extrémités 3'OH et deux liaisons phosphodiester de l'ADN cible, séparées de cinq paires de bases. La réaction d'intégration s'achève par une étape de réparation des ruptures restantes sur les deux brins complémentaires. Cette dernière étape est vraisemblablement réalisée par des enzymes cellulaires.

d'une structure cristalline complète. Cependant, la structure du cœur catalytique isolé de la protéine a été résolue. Celle-ci a révélé un repliement caractéristique de la famille des polynucléotidyl transférases à laquelle appartient également le domaine RNaseH de la transcriptase inverse. Il est intéressant de noter que la très forte homologie structurale des domaines catalytiques de l'intégrase et de la RNaseH suggère que l'on puisse utiliser cette structure comme plateforme commune de conception de produits capables de bloquer les deux enzymes. Toutefois, aucun dérivé ciblant spécifiquement l'activité RNaseH n'est actuellement développé.

Il est largement admis que l'activité des polynucléotidyl transférases requiert la présence d'un ou deux ions divalents dans le site actif de l'enzyme, ce qui a été confirmé pour l'intégrase [9]. Il a donc été proposé que des composés capables de coordonner les ions métalliques et en particulier le Mg^{2+} , co-facteur physiologique de l'intégrase, soient à même d'interférer avec la réaction catalysée par cette enzyme. Dans un premier temps, les criblages ont cependant privilégié l'activité dépendante du Mn^{2+} du fait de l'inactivité inattendue des préparations d'intégrase recombinante en présence de Mg^{2+} . Ces criblages ont mené à l'identification de nombreux inhibiteurs dont aucun n'a montré d'activité cellulaire (pour une revue complète des inhibiteurs de l'intégrase, voir [10]). Cette recherche infructueuse tenant au manque de pertinence physiologique de l'activité Mn^{2+} -dépendante de l'enzyme, plusieurs groupes dont le nôtre ont entrepris d'identifier les déterminants moléculaires de l'activité Mg^{2+} -dépendante. Avec l'équipe de photobiologie moléculaire de Jean-Claude Brochon (ENS Cachan), nous avons démontré que la propension de l'intégrase recombinante à utiliser le Mn^{2+} plutôt que le Mg^{2+} est corrélée à l'oligomérisation différentielle de la protéine en fonction du cofacteur présent (figure 6) [11-12]. Dès lors, il a été possible de tester des composés sur la base de groupements capables d'interagir avec les ions Mg^{2+} . De tels dérivés basés sur la 8-hydroxyquinoléine ont été conçus et synthétisés par le groupe de Jean d'Angelo (CEP, Châtenay-Malabry) (dérivés SQL) [13]. Ces composés se sont révélés d'excellents inhibiteurs de l'activité de 3'-processing de l'intégrase avec une activité antivirale importante. Les études de modélisation moléculaire ont mis en évidence un site de forte affinité pour ces inhibiteurs qui recouvre des résidus impliqués dans la liaison à l'ADN viral expliquant ainsi leur mode d'action. Une seconde famille de produits, basée sur un pharmacophore de type dicéto-acide (ou ADC) s'est révélée également très active (figure 7). Les effets inhibiteurs de ces deux familles sont différents puisque les ADC sont des inhibiteurs spécifiques du transfert de brins [14]. Cette différence d'activité *in vitro* se traduit par deux modes d'actions cellulaires différents du fait de la séparation des deux réactions dans la cellule infectée (voir ci-après).

Mise en évidence de la cible *ex vivo*

Une des principales difficultés de la chimiothérapie antivirale est de déterminer la cible réelle des inhibiteurs dans le contexte de la réplication du virus. L'émergence de résistances à un inhibiteur liée à la présence de mutations dans la séquence de la cible supposée est généralement considérée comme la preuve la plus robuste d'un effet spécifique. La sélection de mutants résistants nécessite de cultiver le virus en présence de quantités croissantes du

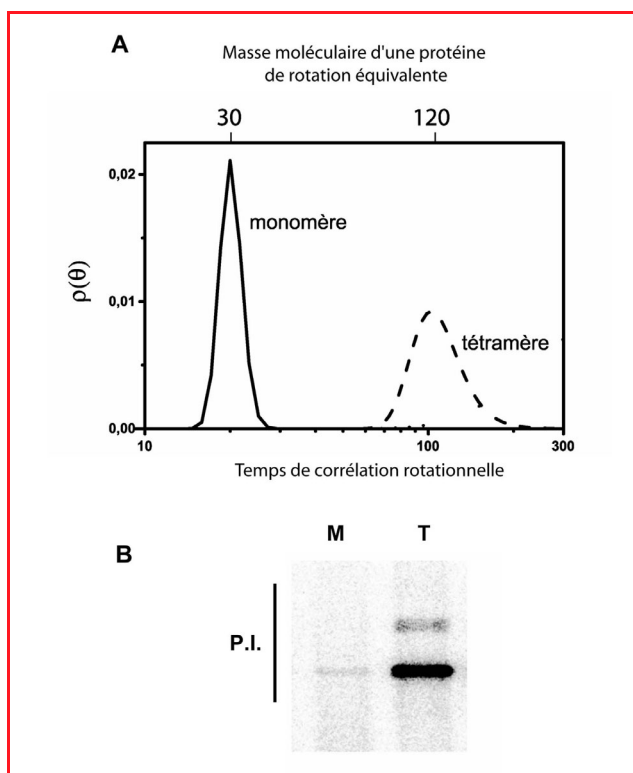


Figure 6 - Étude de la relation entre l'oligomérisation de l'intégrase du VIH-1 et son activité spécifique dépendante du Mg^{2+} .

A : comparaison par mesure de l'anisotropie de fluorescence résolue en temps (AFRT) de l'oligomérisation de deux préparations actives d'intégrase soit en présence de Mn^{2+} (trait plein), soit en présence de Mg^{2+} (trait pointillé).

B : mise en évidence de l'activité dépendante du Mg^{2+} de l'intégrase tétramérique. P.I. : produits d'intégration dans un essai utilisant l'intégrase recombinante et un substrat oligonucléotidique en présence de 10 mM Mg^{2+} . M : IN monomérique. T : IN tétramérique.

composé actif jusqu'à observer une augmentation significative de la dose de celui-ci nécessaire pour bloquer la réplication virale. Le génome du virus est alors séquencé et les mutations responsables de la résistance sont identifiées. Pour apporter la preuve de l'importance de ces mutations, celles-ci sont réintroduites dans un virus sauvage dont on teste la capacité répliquative en présence de l'inhibiteur. Dans le cas des anti-intégrases, une sélection en présence soit de dérivés ADC, soit de dérivés SQL, a fait émerger des mutations effectivement localisées dans l'intégrase, démontrant ainsi que celle-ci est bien la cible intracellulaire de ces composés. Les mutations associées aux deux familles d'inhibiteurs sont différentes. Il n'y a pas de résistance croisée, ce qui montre d'une part que les mécanismes d'action *in vivo* de ces familles sont différents, mais également que celles-ci pourraient être utilisées en combinaison pour ralentir l'apparition des mutants résistants à l'une ou l'autre. Par ailleurs, les deux séries sont actives contre les virus présentant des multi-résistances. A l'heure actuelle, les premières études cliniques de phase I/II sont en cours pour deux composés : le L-870,812 (Merck) et un second produit de type ADC, le S-1360 (Glaxo/Shionogi) (figure 7).

Les inhibiteurs de l'entrée du virus

Avec l'identification de composés anti-intégrase et dans l'attente d'éventuels composés anti-RNaseH, toutes les cibles enzymatiques virales font maintenant l'objet de

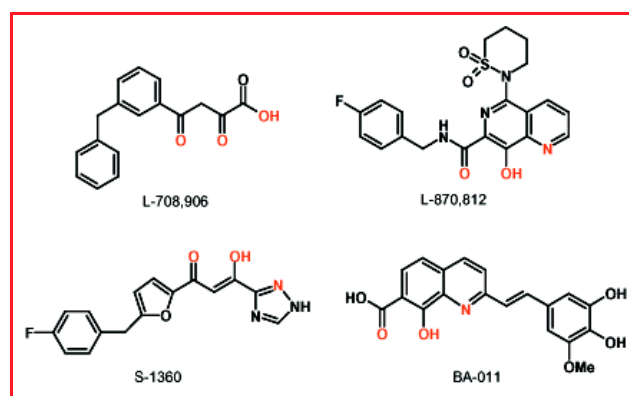


Figure 7 - Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.

Les composés actifs contre l'intégrase et présentant une activité antivirale importante appartiennent soit à la famille des dicétoacides (L-708,906, S-1360), soit à celle des styrilquinolines (BA-011). Les résidus en rouge constituent les pharmacophores putatifs responsables de l'activité anti-intégrase. Les premiers inhibent le transfert de brins tandis que les seconds bloquent le 3'processing. Le composé L-870,810 est une optimisation du composé L-708,906 qui présente un pharmacophore se rapprochant de celui des styrilquinolines.

développements cliniques. Les nouvelles pistes sont donc à présent à rechercher dans l'inhibition de processus non catalytiques résultant par exemple d'interactions entre macromolécules. De ce point de vue, l'entrée du virus dans la cellule est particulièrement riche de possibilités. Il s'agit en effet d'un processus en trois étapes, successivement l'interaction avec le récepteur, avec le co-récepteur et la fusion proprement dite, chacune d'entre elles mettant en jeu des interactions extrêmement spécifiques entre protéines virales et/ou cellulaires [15].

Inhibiteurs de l'interaction CD4/gp120

La première étape de l'entrée du virus est la fixation de la particule virale sur une cellule du fait d'une liaison spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe, la gp120, et le récepteur CD4 présent dans la membrane cellulaire de certaines cellules de l'immunité (lymphocytes T4 et macrophages). Il a été proposé de longue date d'utiliser le récepteur CD4 sous forme soluble pour bloquer les particules virales. Cette approche rencontre depuis peu un certain succès avec la conception d'un anticorps recombinant développé sous l'appellation PRO 542 (« progenics pharmaceutical ») qui a démontré une bonne activité antivirale en phase I/II. Les études se poursuivent actuellement.

Inhibiteurs de l'interaction gp120/co-récepteur

La seconde étape implique la fixation de la gp120 sur un co-récepteur qui peut être soit le récepteur CCR5 (virus dit à tropisme R5), soit le récepteur CXCR4 (virus dit à tropisme X4), selon le type cellulaire infecté. Le potentiel thérapeutique des ligands de CCR5, susceptible de bloquer l'interaction gp120/CCR5, s'est imposé lorsque l'on a découvert que des individus porteurs d'un récepteur inactif étaient résistants à l'infection par le VIH [16]. Les effets à long terme de l'utilisation de ligands des co-récepteurs sont toutefois mal évalués. CCR5 ne devrait pas poser de problème étant donné que l'inactivation de celui-ci ne paraît pas affecter la santé des individus porteurs de cette délétion. Concernant le CXCR4, celui-ci est exprimé sur un plus large rang de cellules et la délétion du récepteur homologue chez

la souris est létale. Les éventuels effets secondaires de ligands de ce récepteur sont donc potentiellement plus importants. Dans ce contexte, deux antagonistes du CCR5, SCH-C et SCH-D (Schering-Plough), actifs contre la majeure partie des isolats viraux, sont actuellement en essais cliniques. Leur activité antivirale *in vitro* est de l'ordre du nanomolaire et ils agissent de façon synergique avec les inhibiteurs de transcriptase inverse et de protéase. Il faut souligner que le développement de résistances contre le SCH-C n'est pas accompagné d'un changement de tropisme du co-récepteur CCR5 vers CXCR4. Un tel changement aurait été potentiellement néfaste car les isolats viraux X4 sont prédominants dans les stades tardifs de la maladie et paraissent plus agressifs que les virus R5. Il existe également un antagoniste puissant du CXCR4, l'AMD070 (Anormed) qui empêche la fixation du ligand naturel du co-récepteur et dont l'activité antivirale est de l'ordre du nanomolaire *in vitro*. L'AMD070 n'a pas d'effet contre les isolats R5. Son action semble également additive ou synergique en combinaison avec les inhibiteurs de fusion, de la reverse transcriptase et de la protéase.

Inhibiteurs de fusion

Finalement, l'interaction de la gp120 avec le co-récepteur découvre la seconde protéine d'enveloppe du virus, la gp41, dont le dépliement permet à son extrémité N-terminale (dit peptide de fusion) de s'ancrer dans la membrane cellulaire (figure 8). En amont de ce peptide de fusion se trouvent deux domaines protéiques (dits HR1 et HR2) dont l'interaction spécifique permet à la gp41 étendue de se replier sur elle-même, favorisant de ce fait le rapprochement de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Au cours de cette fusion, la gp41 étendue est temporairement vulnérable à un agent capable de se lier à l'un des deux domaines bloquant ainsi son repliement [17-18]. Un premier succès a été obtenu avec le T-20 (ou enfurvirtide) (Triméris, Roche), un peptide de 36 acides aminés qui bloque la fusion de l'enveloppe virale

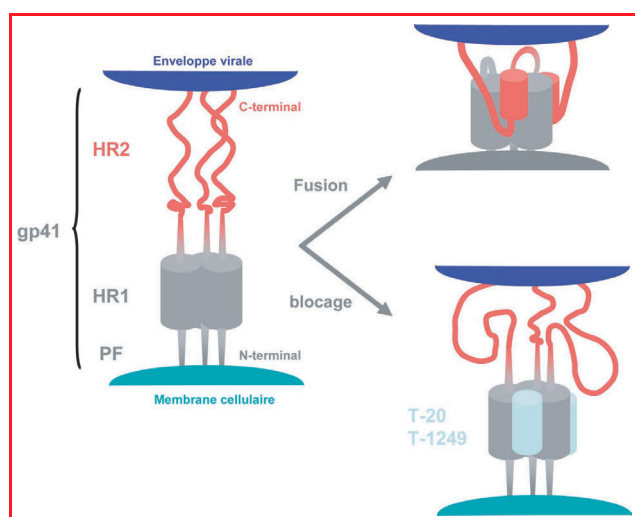


Figure 8 - Mécanisme de fusion de l'enveloppe virale.

L'interaction de la protéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur CD4 et l'un des co-récepteurs permet la libération de la gp41 dont l'extrémité N-terminale (PF : peptide de fusion) vient s'ancrer dans la membrane cellulaire, formant un intermédiaire étendu dans lequel le domaine HR1 est structuré en trimère d'hélices. L'interaction des hélices correspondant au domaine HR2 avec HR1 induit le repliement de la gp41 et le rapprochement de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. Les peptides T-20 et T-1249 dérivés du domaine HR2 bloquent ce repliement et empêchent la fusion.

in vitro et *in vivo*. Les premiers résultats des essais de phase III qui démontrent un bénéfice virologique certain de l'utilisation du T-20 ont été rendus publics récemment [19]. Il est cependant à nouveau clair que des résistances dues cette fois à des mutations dans la gp41 apparaissent rapidement. Un peptide de deuxième génération, le T-1249, qui conserve une activité antivirale contre des souches virales résistantes au T-20 est en cours d'évaluation. Le succès de cette stratégie tient essentiellement au fait que la cible est de nature extracellulaire et donc facilement accessible à un agent pharmacologique. La nature peptidique du médicament vient tout de même tempérer cette réussite. Sa synthèse nécessite plusieurs dizaines d'étapes, entraînant un coût actuel de traitement par l'enfurvirtide (Fuzeon®) de l'ordre de 20 000 \$/an. Par ailleurs, il s'agit d'un traitement par injection sous-cutanée, donc particulièrement contraignant.

Pour finir, notons tout de même que malgré l'apparition constante de nouveaux produits, un grand nombre de progrès récents concernent les traitements déjà disponibles. Il s'agit de l'amélioration des dosages et de l'optimisation de la fréquence des prises, ainsi que la mise au point de formulations multiples permettant la prise simultanée de plusieurs produits. Concernant ces associations, il a été découvert que le ritonavir est un ligand très fort des cytochromes P450 3A4 qui sont des enzymes de détoxication hépatique, responsables de l'élimination de certains produits. L'usage du ritonavir en association avec d'autres IP (notamment l'indinavir) permet d'augmenter la concentration plasmatique de ces produits et par conséquent de diminuer la fréquence de leurs prises.

Conclusion

Malgré une diminution notable, dans les pays occidentaux, de la morbidité et la mortalité dues au VIH du fait des thérapies anti-rétrovirales, l'émergence de virus résistants, les effets secondaires des traitements et surtout l'impact dramatique de la pandémie de sida dans le monde, nécessitent de maintenir un effort de recherche constant. Un nombre croissant de produits capables d'inhiber de nouvelles étapes de la réplication du VIH-1 ont été découverts récemment. L'arsenal des produits de première génération bloquant l'activité des enzymes virales sera vraisemblablement complété dans un futur proche par les inhibiteurs d'intégrase. Ceux-ci sont développés depuis peu sur la base de la compréhension des mécanismes moléculaires des réactions catalysées par cette enzyme. Mais surtout, un progrès important a été obtenu avec les inhibiteurs d'entrée, un processus mettant en jeu des interactions complexes entre protéines. Ces deux exemples témoignent d'une évolution remarquable de la place de la chimie au sein des programmes de pharmacologie anti-VIH. Cette discipline, cantonnée dans les années 1980-90 à un rôle d'optimisation des composés issus des criblages, reprend actuellement toute sa dimension à travers les programmes d'interfaces, au sein desquels virologistes structuraux et chimistes collaborent pour établir et exploiter les modèles d'interactions complexes qui constituent les nouvelles cibles de la pharmacologie. La conception de composés capables de remplacer avantageusement les inhibiteurs peptidiques, coûteux et compliqués d'utilisation, est à elle seule un défi majeur dont l'enjeu est l'obtention d'analogues innovants, accessibles à tous, sans considération d'origine géographique.

Remerciements

Nous remercions l'Agence Nationale de la Recherche contre le Sida (ANRS), Ensemble contre le Sida (ECS) et BioalliancePharma pour leur soutien aux travaux mentionnés dans cet article.

Références

- [1] Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B.H., Wolinsky S., Bhattacharya T., Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains, *Science*, **2000**, *288*, p. 1789.
- [2] Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes, *Nature*, **1999**, *397*, p. 436.
- [3] Bailes E., Gao F., Bibollet-Ruche F., Courgnaud V., Peeters M., Marx P.A., Hahn B.H., Sharp P.M., Hybrid origin of HIV in chimpanzees, *Science*, **2003**, *300*, p. 1713.
- [4] Delfraissy J.F., New French guidelines for antiretroviral treatment, *HIV Med.*, **2000**, *1*, p. 133.
- [5] Palella F.J.J., Delaney K.M., Moorman A.C., Loveless M.O., Fuhrer J., Satten G.A., Aschman D.J., Holmberg S.D., Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators [see comments], *N. Engl. J. Med.*, **1998**, *338*, p. 853.
- [6] Shirasaka T., Kavlick M.F., Ueno T., Gao W.Y., Kojima E., Alcaide M.L., Chokekijchai S., Roy B.M., Arnold E., Yarchoan R., Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, *92*, p. 2398.
- [7] Corbett J.W., Ko S.S., Rodgers J.D., Jeffrey S., Bachelier L.T., Klabe R.M., Diamond S., Lai C.M., Rabel S.R., Saye J.A., Expanded-spectrum nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors inhibit clinically relevant mutant variants of human immunodeficiency virus type 1, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, p. 2893.
- [8] Brown P.O., Integration, *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**, p. 161-203.
- [9] Beese L.S., Steitz T.A., Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *Embo. J.*, **1991**, *10*, p. 25.
- [10] Pommier Y., Marchand C., Neamati N., Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives, *Antiviral Res.*, **2000**, *47*, p. 139.
- [11] Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.-C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.-F., **2000**, Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase, *Biochemistry*, **2000**, *39*, p. 9285.
- [12] Deprez E., Tauc P., Leh H., Mouscadet J.-F., Auclair C., Brochon J.-C., Oligomeric states of the HIV-1 integrase as measured by time-resolved fluorescence anisotropy, *Biochemistry*, **2000**, *39*, p. 9275.
- [13] Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Mekouar K., Desmaele D., Savoure D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J., Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture, **2000**, *J. Med. Chem.*, *43*, p. 1533.
- [14] Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells (in process citation), *Science*, **2000**, *287*, p. 646.
- [15] Chan D.C., Kim P.S., HIV entry and its inhibition, *Cell*, **1998**, *93*, p. 681.
- [16] Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene, *Nature*, **1996**, *382*, p. 722.
- [17] Eckert D.M., Kim P.S., Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, p. 11187.
- [18] Eckert D.M., Kim P.S., Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition, *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, p. 777.
- [19] Lazzarin A., Clotet B., Cooper D., Reynes J., Arasteh K., Nelson M., Katlama C., Stellbrink H.J., Delfraissy J.F., Lange J., Huson L., DeMasi R., Wat C., Delehanty J., Drobnes C., Salgo M., Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, p. 2186.



J.-F. Mouscadet



E. Deprez

Jean-François Mouscadet¹

est directeur de recherche CNRS à l'ENS de Cachan. Il dirige l'équipe de Biologie et pharmacologie des intégrases rétrovirales de l'UMR 8113*.

Éric Deprez²

est chargé de recherche CNRS dans l'UMR 8113 à l'ENS Cachan au sein de l'équipe de Photobiologie moléculaire*.

* LBPA, UMR 8113 CNRS, IFR 121, École Nationale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan Cedex.

¹ Tél. : 01 47 40 76 75. Fax : 01 47 40 76 71.

Courriel : mouscadet@lbpa.ens-cachan.fr

² Courriel : deprez@lbpa.ens-cachan.fr

