

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1992



N 319

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
présentée et soutenue publiquement

le 22 Juin 1992

par

Claire BEGHEIN

Née le 17-12-1966

à BRIVE

LES METHODES D'EVALUATION IN VITRO  
DE L'ACTIVITE DES ANTIRETROVIRAUX

EXAMINATEURS

|                 |                       |           |
|-----------------|-----------------------|-----------|
| M. J.A. NICOLAS | Professeur            | président |
| M. C BOSGIRAUD  | Professeur            | Juge      |
| M. MAURATILLE   | Pharmacien biologiste | Juge      |

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE**

- . **DOYEN de la FACULTE** : **Monsieur le Professeur RABY**  
. **ASSESEURS** : **Monsieur le Professeur GHESTEM**  
(1er Assesseur)  
: **Monsieur DREYFUS, Maître de conférence**  
(2ème assesseur)

• **PERSONNEL ENSEIGNANT**

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| BENEYTOUT Jean-Louis      | Biochimie                                   |
| BERNARD Michel            | Physique . Biophysique                      |
| BOSGIRAUD Claudine        | Microbiologie                               |
| BROSSARD Claude           | Pharmacotechnie                             |
| BUXERAUD Jacques          | Chimie Organique<br>Chimie Thérapeutique    |
| CHULIA Albert             | Pharmacognosie                              |
| CHULIA Dominique          | Pharmacotechnie                             |
| DELAGE Christiane         | Chimie générale et Minérale                 |
| GALEN François-Xavier     | Physiologie                                 |
| GHESTEM Axel              | Botanique et Cryptogamie                    |
| GUICHARD Claude           | Toxicologie                                 |
| HABRIOUX Gérard           | Biochimie Fondamentale                      |
| LEFORT des YLOUSES Daniel | Pharmacie galénique                         |
| NICOLAS Jean Albert       | Bactériologie et Virologie<br>Parasitologie |
| LOUDART Nicole            | Pharmacodynamie                             |
| PENICAUT Bernard          | Chimie Analytique<br>et Bromatologie        |
| RABY Claude               | Pharmacie chimique<br>et Chimie organique   |
| TIXIER Marie              | Biochimie                                   |

. **SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE-CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :**  
**POMMARET Maryse**

**A Monsieur le Professeur J.A. NICOLAS**  
**Professeur des universités de**  
**Bactériologie et Virologie, Parasitologie**

**Vous avez accepté la présidence de**  
**notre thèse,**  
**Veillez y trouver l'expression de**  
**nos sincères remerciements.**

**A Madame le Professeur C. BOSGIRAUD  
Professeur des Universités de  
Microbiologie**

**Vous nous avez fait l'honneur  
de diriger ce travail.  
Nous vous remercions pour les  
conseils prodigués tout au long  
de notre étude.**

**A Monsieur MAURATILLE  
Pharmacien Biologiste**

**Vous nous avez fait l'honneur  
de juger ce travail.  
Veuillez y trouver l'expression  
de notre profonde reconnaissance.**

**A Madame S. BEAUSSOLEIL**

**Nous vous remercions pour la  
disponibilité et l'aide précieuse  
accordées lors de notre travail.**

**A Madame A.M. DEMARS  
A Mademoiselle G. DUBOST**

**Nous vous remercions pour votre  
gentillesse et votre aide lors de la  
réalisation de ce travail.**

# PLAN

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### INTRODUCTION

CHAPITRE I : Les différentes cibles des agents antirétroviraux

CHAPITRE II : La transcriptase inverse

CHAPITRE III : Les différents moyens d'évaluation de l'activité des antirétroviraux *in vitro*

CHAPITRE IV : Méthodes d'étude sur tapis cellulaire

CHAPITRE V : Mise en évidence d'une activité virale

### CONCLUSION

## PARTIE EXPERIMENTALE

### INTRODUCTION

CHAPITRE I : Matériels et Méthodes

CHAPITRE II : Résultats

CHAPITRE III : Discussion

### CONCLUSION

**PARTIE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

## INTRODUCTION

Pendant longtemps, les rétrovirus ont été considérés comme des virus essentiellement animaux, responsables de leucémies et de sarcomes observés chez les poulets (ex. : A.M.V. : Avian Myeloblastis Virus), les souris (ex. M.M.T.V. = Murine Mammary Tumor Virus), et les chats domestiques (ex. : Fe.L.V. = Félin Lymphadenopathy Virus) ou bien d'infections lentes progressives comme le VISNA et le MAEDI du mouton, l'anémie infectieuse des équidés. La découverte du virus HTLV III (Human T Lymphotropic Virus III) comme agent du SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) confirmait que les infections à rétrovirus étaient bien une réalité dans l'espèce humaine.

La pathologie rétrovirale humaine est due aujourd'hui aux virus HTLV I et II, rétrovirus oncogènes agents de leucémies et des virus VIH I et II (Human Immunodeficiency Virus), lentivirus non oncogènes.

C'est en 1981 que fut clairement défini un nouveau syndrome précis, le SIDA, à partir d'informations recueillies au centre de contrôle des maladies infectieuses d'Atlanta. Ce centre reçut des rapports sur plusieurs cas d'infections par *Pneumocystis carinii* et de formes rares de cancers, le sarcome de Kaposi, chez des hommes jeunes tous homosexuels.

En 1983 [1], le virus LAV (Lymphadenopathy associated Virus) fut isolé à l'institut Pasteur à partir de lymphocytes ganglionnaires provenant d'un patient atteint de lymphoadénopathie. Appelés tout d'abord LAV en France et HTLV III aux U.S.A., les virus du SIDA sont actuellement désignés par le terme VIH.

Dès lors les enquêtes épidémiologiques reflétaient l'ampleur de l'infection et son aspect pandémique [2]. En 1990, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.) estimait à 10 millions le nombre de sujet séropositifs dans le monde et à 1 million le nombre d'individus en phase SIDA déclarée. Ce même organisme évalue, pour l'an 2000, le nombre de séropositifs à 30 / 40 millions et à 15 millions le nombre de cas de SIDA. Le SIDA est ainsi devenu "le défi scientifique et social" de cette fin de XXème siècle (titre donné à la Vème conférence internationale sur le SIDA qui s'est tenue au début du mois de Juin 1989 à Montréal).

Les besoins de la thérapie sont donc immenses et les objectifs multiples :

- Définir les cibles et les différentes phases de réplication du virus de manière à mieux connaître les structures virales invariables.

- Un second objectif est la mise au point d'antirétroviraux capables de tuer le virus sans lèsurer la cellule hôte. Pour cette raison, la transcriptase inverse, enzyme propre aux rétrovirus, reste une cible de choix.

- Un troisième objectif est la mise au point d'antibiotiques plus efficaces contre les infections opportunistes.

- Une dernière voie de la thérapie anti SIDA consiste en une immunothérapie palliative à base de composés tels que les interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  et l'interleukine II.

## **I. LES DIFFERENTES CIBLES DES AGENTS ANTIRETROVIRAUX**

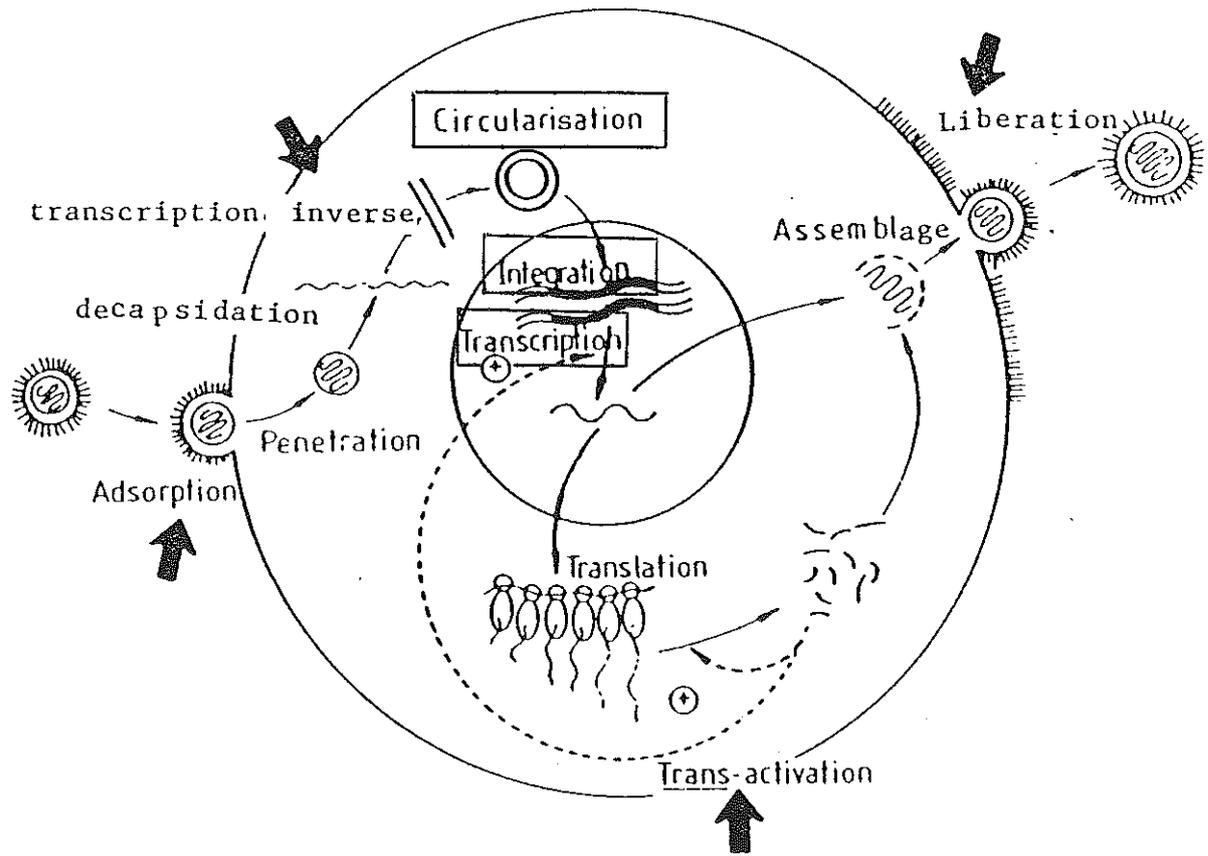
Tous les stades de l'infection virale depuis l'adsorption du virus sur la cellule hôte jusqu'à la libération des virions sont des cibles potentielles pour les antirétroviraux. Cependant, comme le souligne le schéma I, quatre cibles principales ont été retenues par les scientifiques : l'adsorption, la transcription inverse, la trans-activation, la maturation du virus (bourgeonnement, clivage, glycosylation, myristilation).

L'activité de nombreuses molécules a été éprouvée sur le VIH en particulier (cf. Tableau I). L'une des cibles de la chimiothérapie antirétrovirale la plus attractive reste la transcriptase inverse.

**Tableau I : les molécules actives contre le HIV.**

| CIBLE                     | Molécules Actives  |
|---------------------------|--|
| ADSORPTION                | Héparine, sulfate de dextran, peptide T  |
| TRANSCRIPTION-<br>INVERSE | Suramine, AZT (Azidothymidine) ; HPA 23 ;<br>ATA (Acide Aurintricarboxylique) ; PFA (Phosphonoformate) ; les analogues 2', 3' didés-<br>oxynucléosides |
| TRANS-ACTIVATION          | D-pénicillamine  |
| LIBERATION                | Interféron, inducteurs d'interférons   |

Schéma I : Cycle d'infection d'une cellule par un rétrovirus et les différentes cibles pour les antirétroviraux. [3]



: Phases aujourd'hui inaccessibles à toute approche thérapeutique

↑ : Les quatre cibles principales des antiviraux

## II. LA TRANSCRIPTASE INVERSE (T.I.)

### 1<sup>o</sup>) Les activités enzymatiques de la T.I. :

La transcriptase inverse est l'appellation générique d'un complexe portant au moins trois activités enzymatiques distinctes : Une activité ADN polymérase utilisant comme matrice indifféremment l'ADN ou l'ARN, une activité RNase dégradant spécifiquement l'ARN hybridé (ADN-ARN), une activité endonucléasique (ou intégrase) responsable de la circularisation de l'ADN bicaténaire et de son intégration dans le génome de la cellule hôte.

La T.I. polymérise l'ADN dans le sens 5' → 3' et requiert la présence d'une amorce permettant le démarrage de la synthèse. Cette amorce, nécessaire à l'initiation de la réplication virale, est un ARNt spécifique du virus concerné (ARNt proline pour les virus murins, ARNt tryptophane pour le virus du sarcome de Rous (RSV), ARNt lysine pour le MMTV (mouse mammary tumor virus), le HIV et le VISNA.

La transcriptase inverse polymérise l'ADN plus lentement que les autres polymérases et avec un taux d'erreur plus élevé. Ces défauts de réplication sont source de nombreuses mutations pouvant générer des virus défectifs pour une des fonctions virales.

La RNase est une exonucléase dégradant l'ARN hybridé dans deux sens : 5' → 3' et 3' → 5'. Les produits de cette dégradation sont des oligonucléotides 3'-OH et 5'-P de 6 à 10 résidus de long.

L'activité endonucléasique a pour mission de circulariser l'ADN proviral en abouchant les deux séquences LTR (Long Terminal Repeat). Sous cette forme circulaire, l'ADN proviral s'intègre dans le génôme de la cellule hôte.

## **2°) La réplication :**

La finalité de cette étape est la synthèse de l'ADN proviral. La transcriptase inverse doit copier un ARN monocaténaire en ADN bicaténaire capable de s'intégrer dans le génôme de la cellule hôte. Ils pourront ultérieurement être transcrits en ARN viraux génomiques qui serviront à leur tour de modèle pour un nouveau cycle réplicatif. Dans l'étude du mécanisme de réplication (schéma II), l'ARN viral est un ARN positif ; le premier brin d'ADN complémentaire de cet ARN sera un brin (-) et le second brin complémentaire de l'ADN (-) sera un brin (+).

La synthèse de l'ADN (-) débute par la fixation de l'ARNt au niveau du site PB (Primer Binding) de l'ARN viral. A partir de cette amorce, l'ADN polymérase ARN dépendante copie successivement les régions U5 et R de la matrice virale. La poursuite de la réplication fait intervenir un premier saut transcriptionnel vers l'extrémité 3'. Cette phase s'accompagne de la dégradation des séquences R et U5 de l'ARN par l'activité RNase de la transcriptase inverse. A la fin de la synthèse du brin (-), la plus grande partie de l'ARN génomique est dégradée, ne laissant qu'une amorce de quelques nucléotides pour l'initiation de la synthèse du brin (+), en appariement avec l'extrémité 5' du brin (-).

A ce niveau de la réplication, le début du brin (+) effectue le second saut transcriptionnel vers l'extrémité 3' du brin (-), en complémentarité avec le site PB'. La réplication du brin (+) s'achève donc par copie du brin (-).

L'ADN bicaténaire linéaire ainsi produit comportera à chaque extrémité une structure formée de U3,R et U5 appelée LTR (Long Terminal Repeat). Cet ADN proviral sera circularisé par une endonucléase, étape obligatoire pour l'intégration. Il sera soit exprimé grâce aux enzymes cellulaires, soit réprimé et transmis de façon latente aux cellules filles lors des différentes mitoses.

## Schéma II : les différentes étapes de la réplication

### CHRONOLOGIE :

1) Fixation du tARN amorce, et début de la synthèse d'ADN (-)

2) Dégradation de R et U5 par le RNase H

3) Premier saut réplicatif

4) Elongation du brin d'ADN (-)

5) Dégradation de l'ARN viral

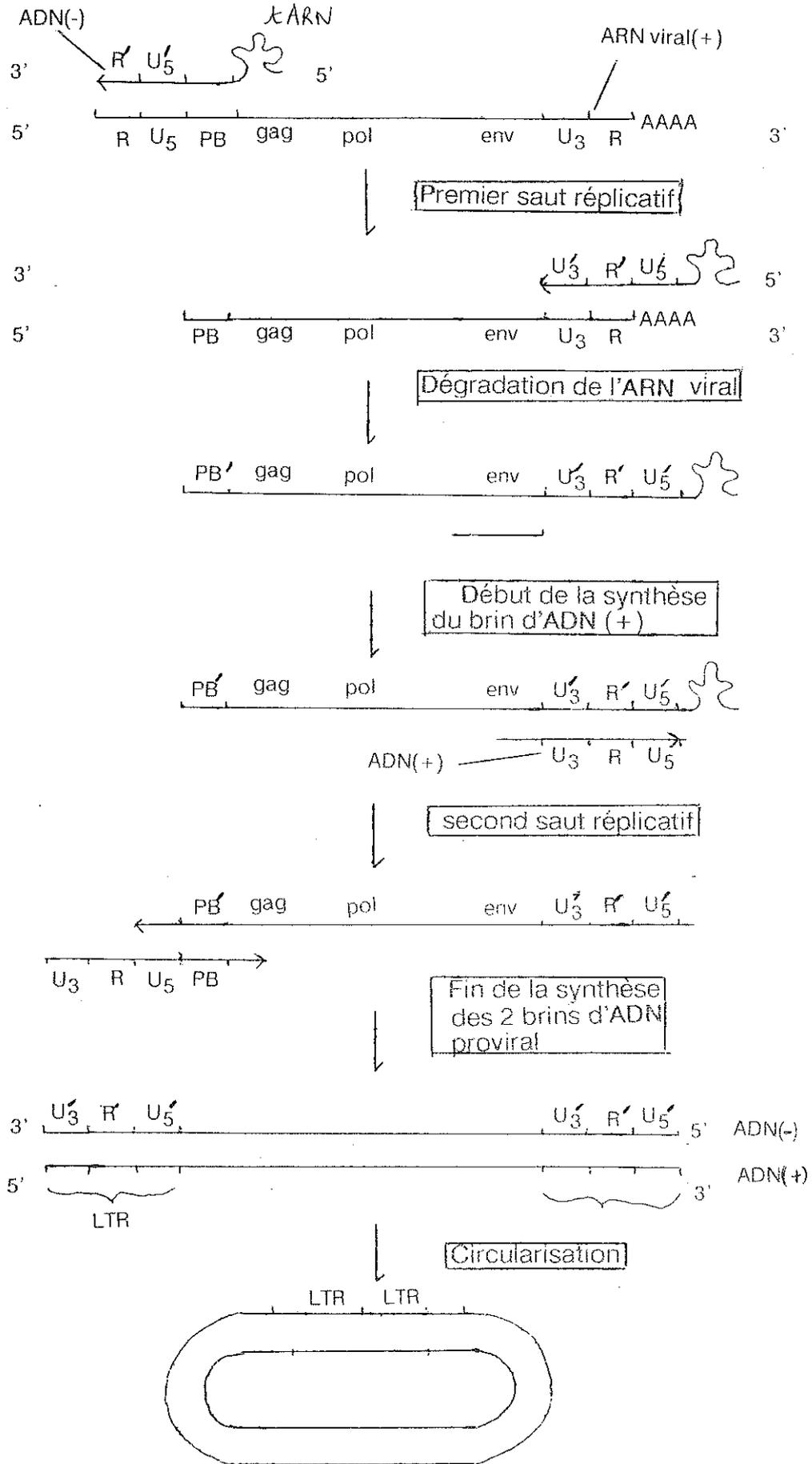
6) Début de la synthèse du brin d'ADN (+)

7) Dégradation complète de l'ARN viral restant et second saut réplicatif

8) Elongation

9) Fin de la synthèse des 2 brins d'ADN proviral

10) Circularisation



### **3°) Classification des inhibiteurs de la T.I. :**

Cette classification est établie en fonction des sites et des modes d'action des molécules inhibitrices (cf. schéma III) [4]

#### **3-1) Inhibiteurs actifs directement sur l'enzyme :**

Suivant leur site de fixation, ils sont subdivisés en deux groupes : les composés agissant au niveau du site de liaison du modèle-amorce (suramine, HPA 23) et ceux agissant au niveau du site de liaison des nucléosides (AZT, dideoxynucléosides).

La suramine et le HPA 23 bloquent ainsi le site enzymatique de la transcriptase inverse.

Les analogues des nucléosides (AZT, dideoxynucléosides) ne sont actifs qu'après avoir été triphosphorylés par une thymidine kinase cellulaire. Leur action est double. Soit, ils sont incorporés dans l'ADN à la place du nucléoside naturel bloquant ainsi toute nouvelle incorporation nucléosidique ce qui conduit à un ADN incomplet non fonctionnel. Soit, ils ne sont pas reconnus par la T.I. et par conséquent ils ne peuvent pas être incorporés dans l'ADN en élongation.

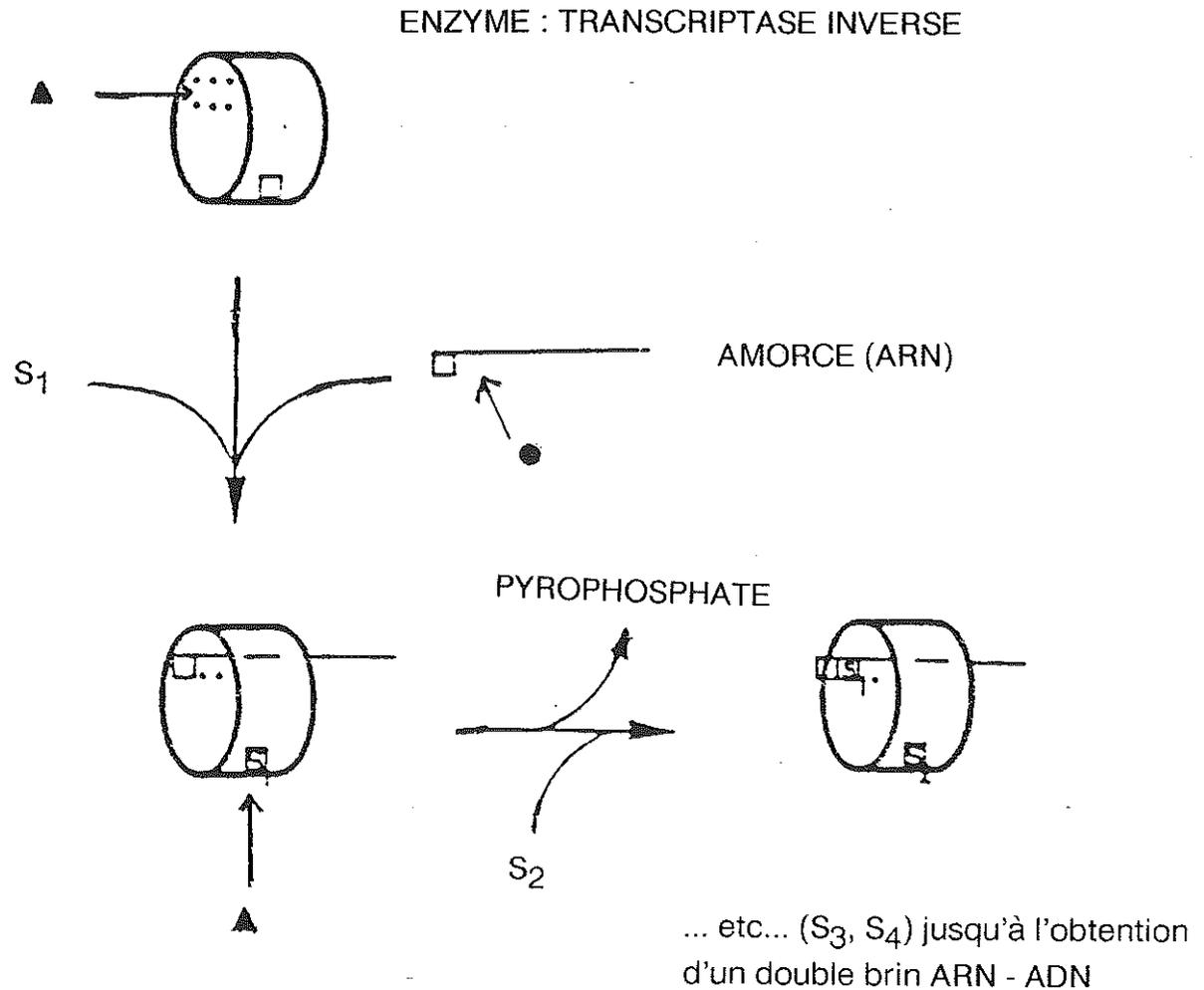
#### **3-2) Inhibiteurs se liant au modèle-amorce**

Cette classe comporte des composés polyanioniques tel que le phosphonoformate (PFA) et des substances polyribonucléotidiques et oligonucléotidiques.

Comme le montre le schéma III, avant d'être incorporés dans la chaîne d'acide nucléique, les nucléosides naturels doivent être triphosphorylés. L'intégration dans l'ADN se fait par formation d'une liaison phosphodiester après libération d'une molécule de pyrophosphate. Le PFA, analogue du pyrophosphate, empêche la formation des nucléotides monophosphates.

Les polyribo et oligonucléotides se lient à l'ARN viral. La transcriptase inverse ne peut, ainsi, plus copier l'ARN monocaténaire.

**Schéma III** : Schématisation de la cinétique de la polymérisation et des sites d'action des inhibiteurs [4]



Légende :

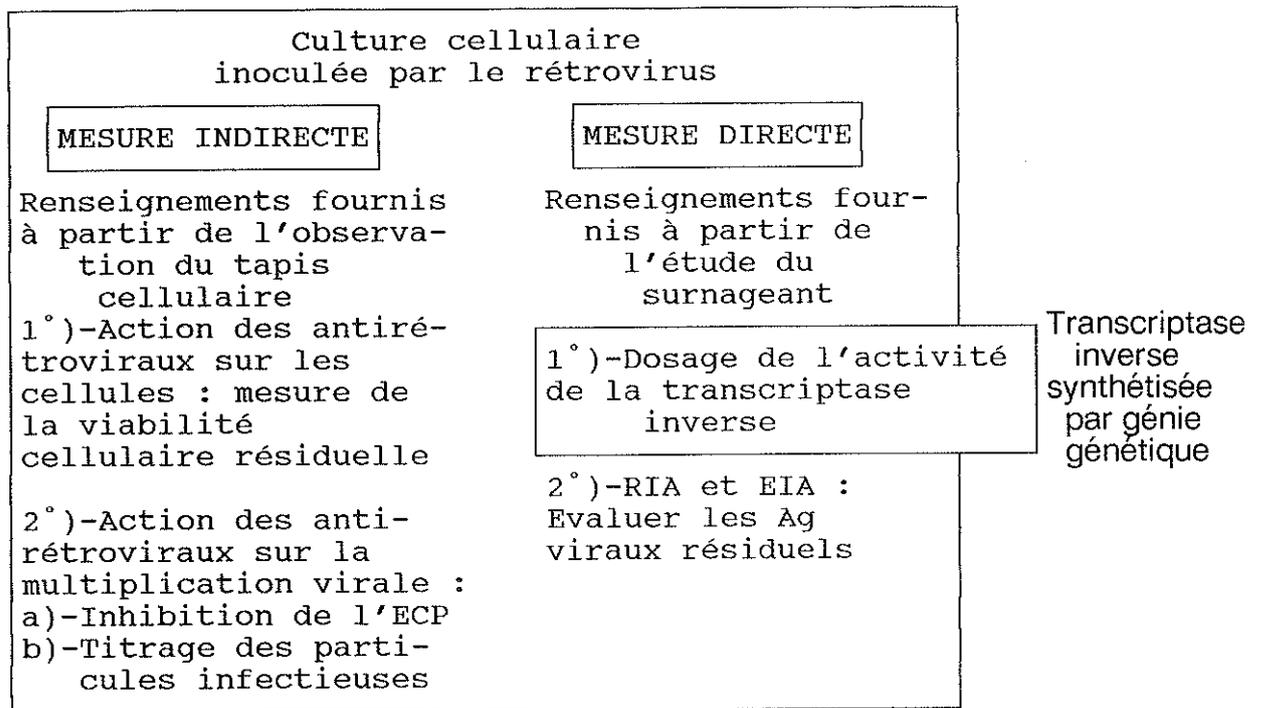
- : Site de liaison du substrat
- S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, ... : substrats (nucléosides)
- ⋮ : Sites de liaison du modèle-amorce
- ▲ → : Sites d'action des inhibiteurs agissant sur l'enzyme
- → : Site d'action des inhibiteurs se liant au modèle-amorce

### **III LES DIFFERENTS MOYENS D'EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE DES ANTIRETROVIRAUX (SCHEMA IV)**

L'évaluation *in vitro* de l'activité antirétrovirale repose sur deux principes.

Des cultures permissives sont infectées directement par le rétrovirus. L'inhibition de la réplication virale sera réalisée après détermination de la cytotoxicité des composés testés sur les cellules. L'inhibition peut aussi être mesurée par l'activité des enzymes virales spécifiques, comme la transcriptase inverse, obtenues par génie génétique [5,6,7,8,9]. L'avantage de ce procédé est de mettre à la disposition des chercheurs de grandes quantités d'enzymes pures en comparaison de celles fournies par la culture cellulaire.

**Schéma IV** : Schéma récapitulatif des différentes méthodes d'évaluation *in vitro* des composés inhibiteurs des rétrovirus.



## IV. METHODES D'ETUDE SUR TAPIS CELLULAIRE :

### 1°) Evaluation de la cytotoxicité des inhibiteurs :

Avant de quantifier les éventuels effets inhibiteurs d'un composé, il convient de déterminer le degré de toxicité de la molécule sur les cellules non infectées. La formule mathématique suivante permet de l'évaluer : [10].

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 100 \times \left[ \frac{1 - N_{cT}}{N_c} \right]$$

$N_{cT}$  représente le nombre de cellules viables cultivées en présence d'inhibiteur et  $N_c$  le nombre de cellules viables cultivées sans addition de composé. Le nombre de cellules viables correspond au nombre de cellules vivantes après un certain délai de culture cellulaire. Leur dénombrement est réalisé par les techniques décrites au IV 3°)

Les pourcentages obtenus évaluent le surcroît de mort cellulaire induite par la molécule par rapport au témoin (le témoin étant la culture cellulaire non infectée et non traitée, soumise aux mêmes conditions expérimentales et permettant la détermination de  $N_c$ ). Les résultats s'échelonnent entre 0 % (le composé n'est pas cytotoxique) et 100 % (cytotoxicité maximale). Entre ces deux extrêmes, tous les résultats intermédiaires témoignent d'une cytotoxicité quantifiable. Dans l'exemple choisi (tableau II), la cytotoxicité maximale est observée avec l'oligodesoxynucléotide n - ODN-2.

Cette étude permet d'une part de comparer la cytotoxicité de différents inhibiteurs et d'autre part de déterminer la toxicité cellulaire d'une même molécule en fonction de sa concentration. Menée en parallèle avec l'évaluation de l'effet antiviral des composés testés, elle permet de sélectionner les inhibiteurs offrant le meilleur compromis cytotoxicité - effet antiviral (tableau II).

**Tableau II** : Evaluation de la cytotoxicité et de l'effet antiviral des analogues du phosphorothioate sur le HIV [10]

| Compound <sup>†</sup> | Antiviral effect,* % |         |          |          | Cytotoxicity, <sup>†</sup> % |         |          |          |
|-----------------------|----------------------|---------|----------|----------|------------------------------|---------|----------|----------|
|                       | 1<br>μM              | 5<br>μM | 10<br>μM | 25<br>μM | 1<br>μM                      | 5<br>μM | 10<br>μM | 25<br>μM |
| S-ODN-1               | 0                    | 43      | 72       | 95       | 0                            | 0       | 0        | 20       |
| n-ODN-1               | 3                    | 2       | 9        | 4        | 35                           | 22      | 27       | 14       |
| M-ODN-1               | 8                    | 20      | 13       | 10       | 20                           | 27      | 20       | 20       |
| S-ODN-2               | 11                   | 56      | 100      | 78       | 0                            | 0       | 0        | 6        |
| n-ODN-2               | 11                   | 9       | 0        | 11       | 18                           | 28      | 35       | 32       |
| S-ODN-3               | 0                    | 6       | 44       | 94       | 0                            | 0       | 0        | 13       |
| S-ODN-4               | 0                    | 53      | 78       | 100      | 0                            | 0       | 0        | 0        |
| → S-dC <sub>14</sub>  | 25                   | 100     | 100      | 100      | 0                            | 0       | 0        | 0        |

Légende : ‡:ODN signifie oligodesoxynucléotide. S représente l'analogue phosphorothioate de la séquence donnée, M l'analogue méthylphosphonate et n l'ODN non modifié.

† : le % de cytotoxicité est calculé par la formule déjà décrite.

\*: L'effet antiviral correspond au pourcentage d'effet protecteur des composés sur la survie et la croissance des cellules exposées au virus. Il est déterminé par la formule suivante :

$$100 \times \frac{\text{nombre de cellules viables exposées au virus et cultivées en présence de composé} - \text{nombre de cellules viables exposées et non traitées}}{\text{nombre de cellules viables non infectées, non traitées} - \text{nombre de cellules viables infectées, non traitées}}$$

Par application de cette formule, les pourcentages égaux à 100 % représentent un effet protecteur sans cytotoxicité pour les cellules cibles donc un effet antiviral considéré comme optimal *in vitro* .

→ : Ce symbole signale le dérivé pour lequel on enregistre l'effet antiviral le plus important conjugué à une cytotoxicité nulle : Il représente donc le meilleur compromis cytotoxicité / effet antiviral.

## **2°) Evaluation de l'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire [11]**

Elle a permis d'étudier l'effet de l'AZT (Azidothymidine) sur la croissance et la viabilité de deux types de lignées cellulaires : des cellules H9 et des cellules JURKAT. L'effet de l'inhibiteur sur la croissance cellulaire est déterminé sur une période de 3 jours après infection par le virus HIV durant laquelle les cellules sont en croissance logarithmique.

Cette technique repose sur la comparaison de la croissance de cellules saines non infectées et de cellules infectées en fonction de la concentration d'inhibiteur ajouté au milieu de culture.

Les résultats obtenus sont donnés sous forme de courbe :  
 $\log(\text{nombre de cellules}) = f.(\text{nombre de jours de culture}).$

## **3°) Mesure de la viabilité cellulaire :**

Cette étude permet d'une part d'évaluer la cytotoxicité des molécules antirétrovirales. Un composé doit idéalement inhiber la réplication et la multiplication du virus sans léser la cellule : dans ce cas la croissance des cellules est suivie en présence de la substance à tester. D'autre part la viabilité cellulaire résiduelle après infection représente un autre moyen d'étude d'une activité antirétrovirale.

**3-1) Méthode de coloration des cellules au MTT ([4,5 - diméthylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphényle tétrazolium) et au XTT (hydroxyde de 2,3 - bis [2 - méthoxy - 4 - nitro - 5 - sulfophényl] - 5 [phénylamino carbonyl] - 2H - tétrazolium).**

### **a) Principe :**

Ces deux colorants sont des marqueurs de viabilité cellulaire. Quand une cellule conserve son intégrité, c'est à dire avec ses métabolismes intacts, le colorant vital est réduit en FORMAZAN par une enzyme mitochondriale. Ce passage de la forme tétrazolium à la forme FORMAZAN s'accompagne d'un changement de couleur. (Schéma V)

Schéma V :

TETRAZOLIUM

FORMAZAN

MTT (jaune)

réduction

(bleu violet)

----->

XTT (incolore)

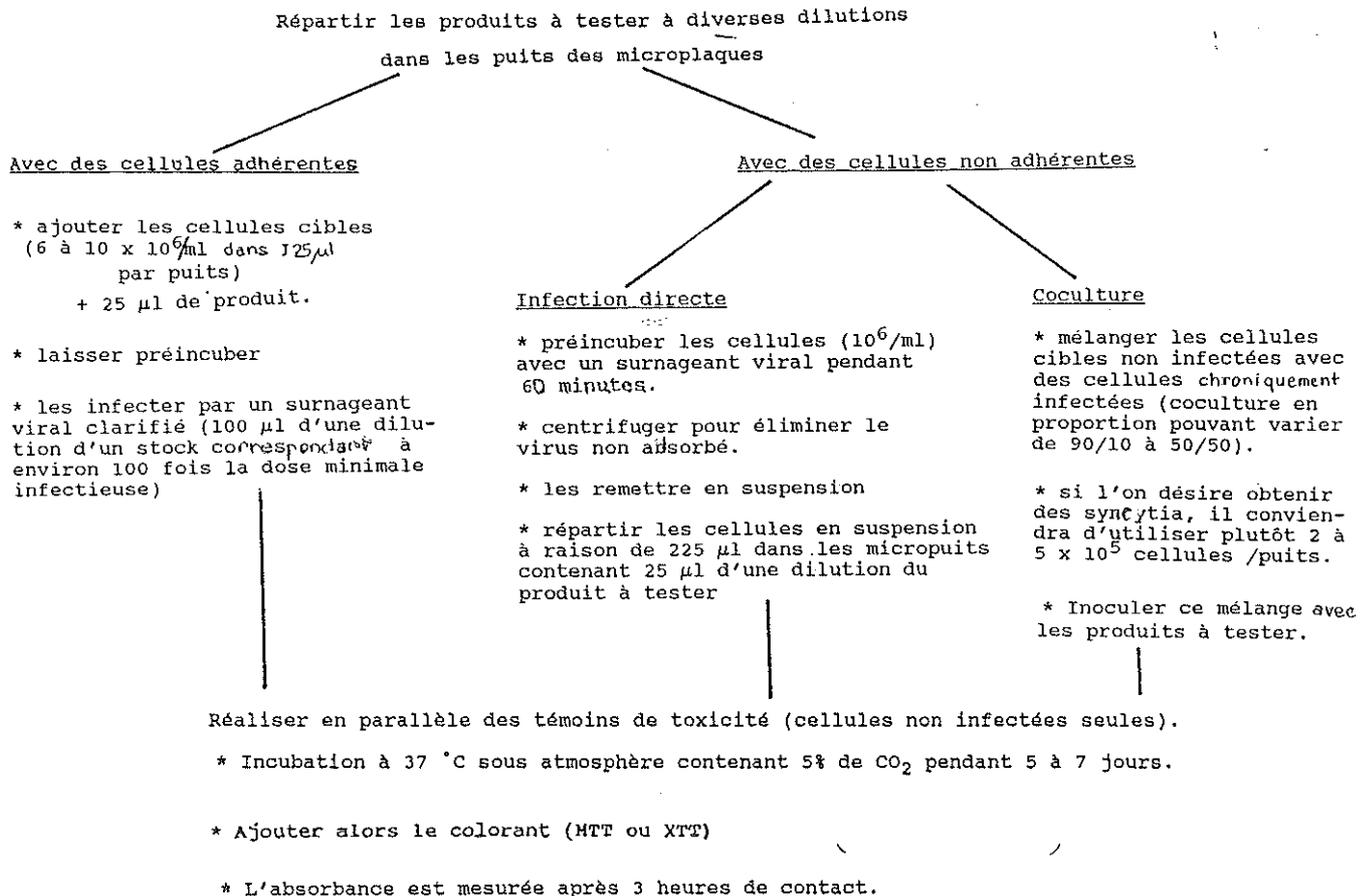
réduction

(rouge orangé)

----->

La modification chimique du colorant s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption. Dans le cas d'une coloration par le XTT, la lecture se fait à 450 nm dans un lecteur de microplaque standard disposant d'un filtre. Pour le MTT, le colorant réduit précipite. Il faut le solubiliser dans de l'isopropanol acidifié. On peut néanmoins éviter cette manipulation supplémentaire en ajoutant de l'isopropanol en fin de journée, en couvrant les plaques avec un film autocollant et en laissant incuber une nuit à l'obscurité. La lecture s'effectue entre 540 et 600 nm.

b) Procédé utilisé : [12]



### c) Intérêts et limites :

L'intérêt de cette technique de coloration est double. Elle permet d'une part d'évaluer l'effet d'un composé sur les cellules à des concentrations différentes et d'autre part de tester un grand nombre de molécules pour l'inhibition de la réplication du HIV. Cependant le fait que ce test ne peut s'appliquer qu'à des lignées cellulaires subissant, lors de l'infection par le virus, un ECP important (la limite a été fixée à 50 % de lyse minimale 7 jours après l'infection) limite son utilisation.

## **3-2) Méthode d'exclusion au bleu trypan**

### a) Principe :

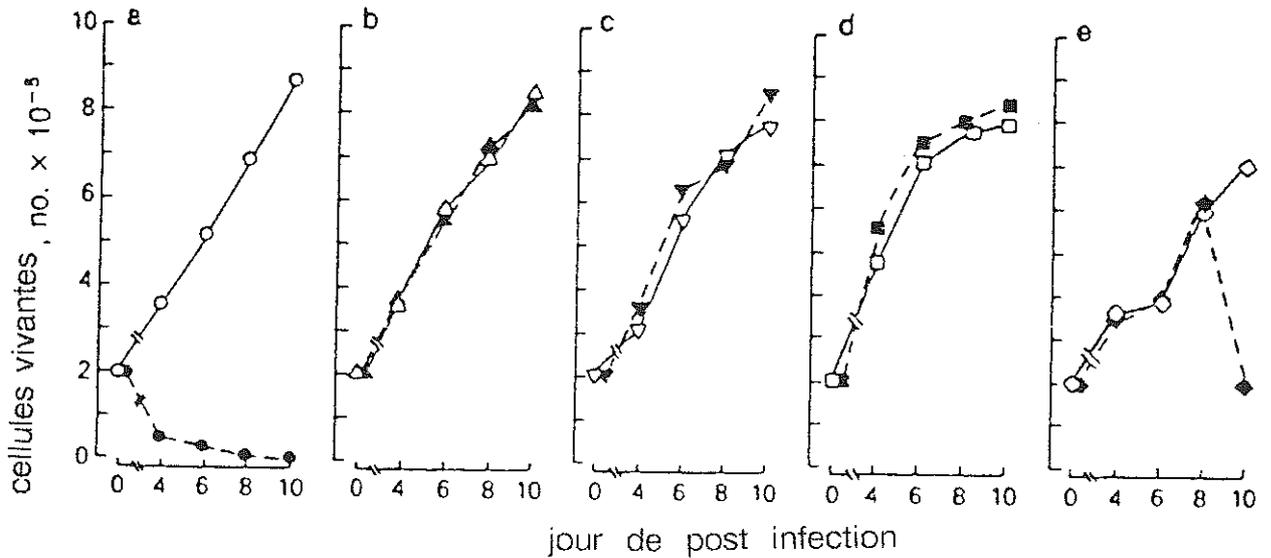
Ce procédé consiste à dénombrer les cellules excluant un colorant vital : le bleu trypan. Les cellules mortes sont seules à se colorer. Ainsi on peut vérifier la viabilité des cellules par comptage de celles-ci en présence de bleu trypan. Leur dénombrement est effectué par les techniques de comptage classiquement utilisées en cytologie ( hémocytomètre, cellule de Malassez).

### b) Méthodologie : [13] - [14]

Toutes les méthodes décrites reprennent les mêmes étapes que pour la détermination de l'inhibition de l'ECP. Pour résumer, des cellules permissives au rétrovirus sont cultivées dans les puits de microplaques. Elles sont alors infectées par une suspension virale, de titre déterminé, puis le composé antirétroviral est ajouté à différentes concentrations. L'essai est répliqué plusieurs fois. Des témoins cellulaires sont mis en contact avec le bleu trypan et les cellules vivantes non perméables au colorant sont alors dénombrées avec un hémocytomètre.

Ce type de test évalue le nombre de cellules vivantes dans les cultures traitées et non traitées en fonction du jour de post infection et de la concentration d'inhibiteur. Les résultats obtenus se présentent sous forme de courbe ou de diagramme (Schéma VI).

**Schéma VI** : Effets des dideoxynucléosides sur la viabilité des cellules ATH<sub>8</sub> (clone de cellule T. OKT<sub>4</sub>+) infectées par le HIV.[14]

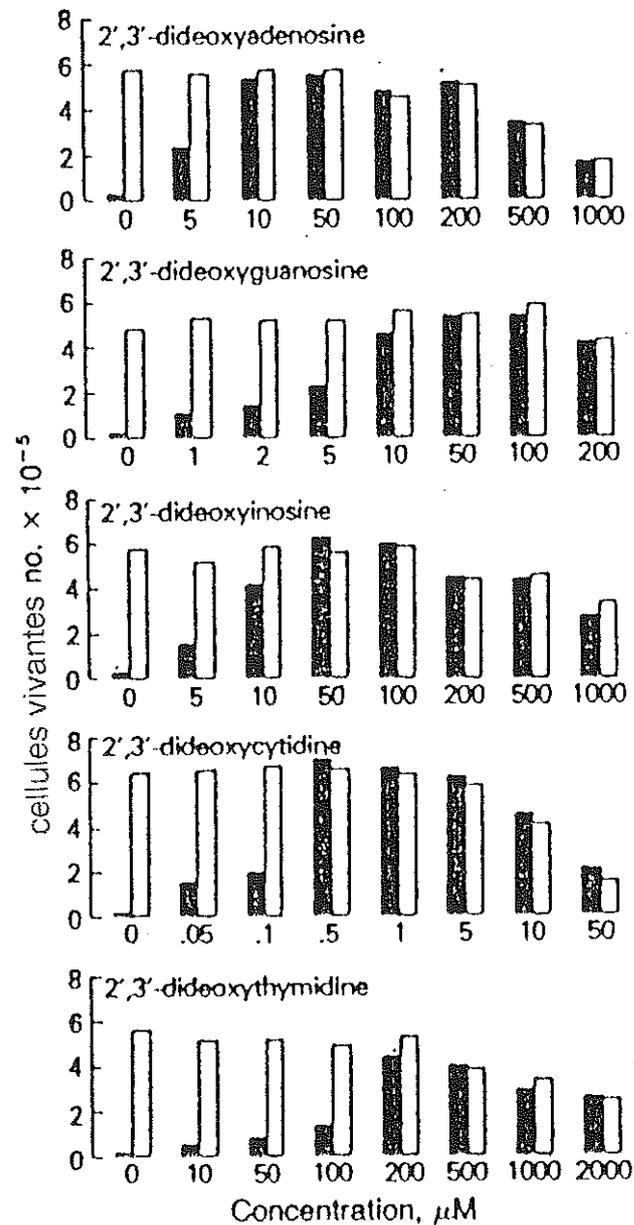


A - Viabilité des cellules en fonction du temps de culture.

Les symboles vides (○,△,□) correspondent aux cellules non exposées au virus et les symboles pleins (●,▲,■) aux populations cellulaires infectées. En (a) la culture ne contient pas de dideoxynucléosides. Les cultures sont exposées en (b) à 50 μM de 2',3' dideoxyadénosine, en (c) 50 μM de 2',3' dideoxyinosine, en (d) à 1 μM de 2',3' dideoxycytidine, en (e) à 50 μM de dideoxythymidine.

On constate que les dideoxynucléosides améliorent la survie des cellules infectées.

**Schéma VI : Effets des didéoxynucléosides sur la viabilité des cellules ATH<sub>8</sub> (clone de cellule T. OKT<sub>4</sub><sup>+</sup>) infectées par le HIV.[14] (suite)**



**B - Viabilité des cellules en fonction de la concentration de composé à tester.**

Les cellules ATH<sub>8</sub> ( $2 \times 10^5$ ) sont mises en contact avec le HIV (2 000 particules virales/ml) en présence ou non de différentes concentrations de 2', 3'-dideoxyadénosine, - inosine, - guanosine, - cytidine ou - thymidine. Les témoins cellules (colonnes vides) sont traitées de la même manière mais ne sont pas infectées. Le 5<sup>ème</sup> jour, on dénombre les cellules vivantes.

Ce test permet d'établir que l'augmentation de la survie cellulaire constatée en A est dose dépendante.

Au delà d'une certaine marge, les didéoxynucléosides tuent les cellules.

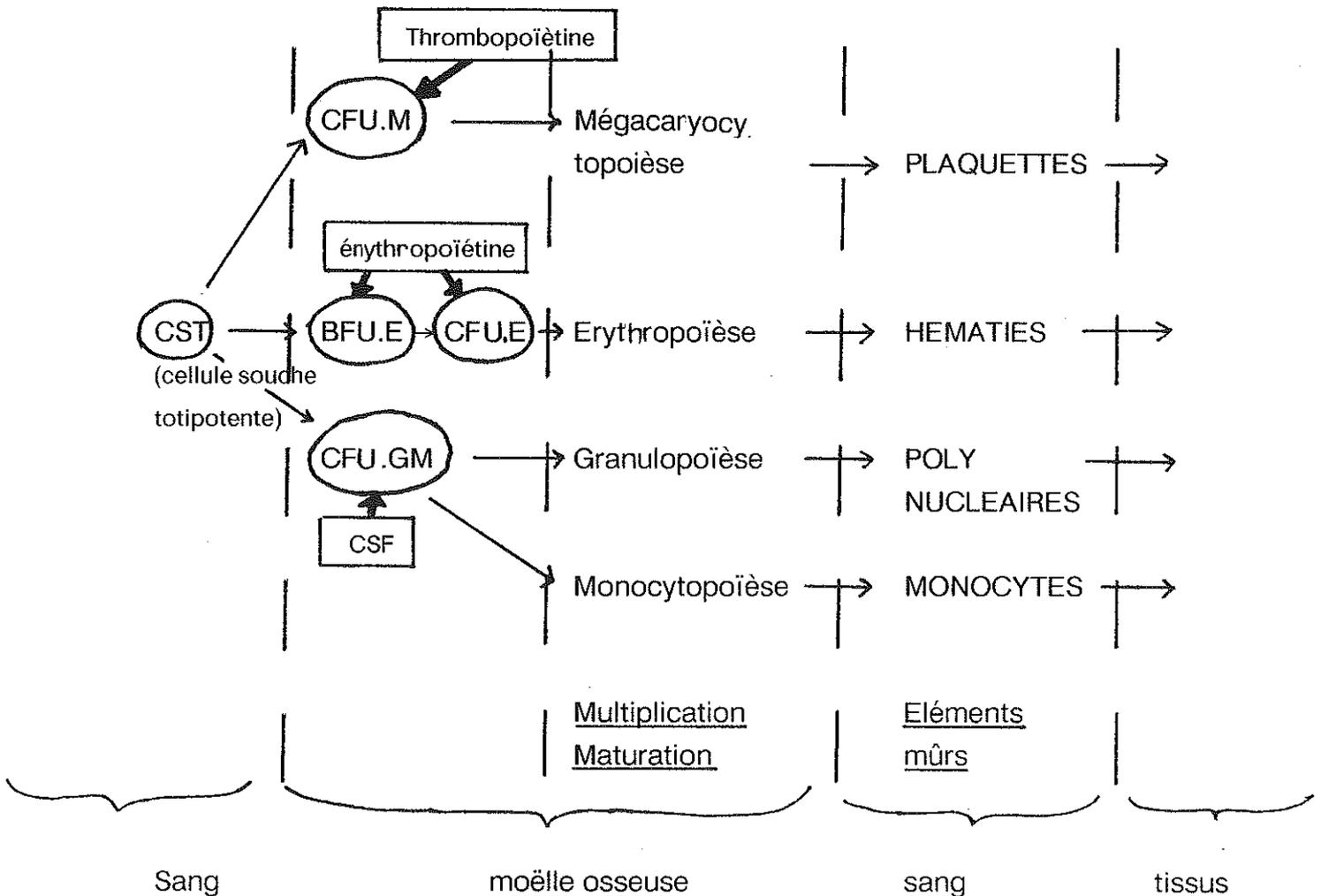
### **3-3) Evaluation de la toxicité hématologique des anti-HIV *in vitro***

#### **a) Principe :**

Le but de ces essais est de reproduire *in vitro* un phénomène biologique observé lors de l'hématopoïèse (cf. Schéma VII). Les cellules souches myéloïdes CFU-E (Cell Forming Unit déclenchant l'Erythropoïèse) et CFU-GM (Cell Forming Unit précurseur de la Granulopoïèse et de la Monocytopoïèse) ont la propriété de former des colonies individualisées et des agrégats *in vitro* avant de synthétiser les hématies, les macrophages et les monocytes ( Schéma VII). *In vitro*, ce phénomène peut être imité dès lors que les cellules myéloïdes son stimulées par le facteur adéquat : l'erythropoïétine pour les CFU-E et le CSF (facteur stimulant des colonies) pour les CFU-GM.

Le principe de ces tests consiste à mesurer l'inhibition de la formation de colonies et d'agrégats provoqués par les antirétroviraux.

## Schéma VII : rappel sur l'hématopoïèse



Légende : Les cellules souches précurseurs sont entourées . Les facteurs biologiques de stimulation indispensables sont encadrés.

L'hématopoïèse est un ensemble de mécanismes assurant la production continue des différentes cellules sanguines en fonction de leur durée de vie et des besoins à partir de cellules myéloïdes souches. De nombreuses molécules anti-HIV inhibent ce processus probablement en agissant au niveau des cellules souches.

### b) Méthodologie : [14]

L'origine des cellules souches myéloïdes normales est soit animale [15], soit humaine [16]. Elles sont héparinées afin d'éviter la coagulation puis séparées par centrifugation en gradient de densité. Les populations cellulaires pures sont ensuite cultivées avec le facteur nécessaire à la formation de colonies. Ces essais s'effectuent sur microplaques. Les populations cellulaires sont soumises à l'effet d'Anti-HIV à différentes concentrations. Un témoin cellule non traité est réalisé. Après incubation à 37°C pendant quelques jours, les colonies et les agrégats sont dénombrés au microscope soit directement, soit après coloration par le 3,3' - diaminobenzidine .[15]

Les premiers résultats obtenus pour le HPA 23 et l'AZT sont encourageants : ils témoignent d'une inhibition dose - dépendante.

### c) Intérêts :

La toxicité hématologique est un effet secondaire constant chez les patients atteints du SIDA et sous traitement (AZT, HPA23, didéoxynucléosides ...). C'est aujourd'hui le facteur limitant de la chimiothérapie anti-HIV : Les anémies et les neutropénies induites imposent souvent l'arrêt du traitement. Le but de cette étude est de préciser la toxicité des antirétroviraux sur l'hématopoïèse. Cependant les résultats expérimentaux ont une importance clinique encore incertaine. Ils doivent néanmoins être pris en compte dans la définition optimale des posologies de l'HPA 23 et de l'AZT chez les patients infectés par le HIV. Ce test pourrait dans un avenir proche permettre de déceler et quantifier la toxicité hématologique des composés avant l'étude *in vitro* de leurs effets. Il pourrait aussi aboutir à une meilleure compréhension du mécanisme responsable de cet effet secondaire.

#### 4°) Effet de l'inhibiteur sur la multiplication virale :

##### 4-1) Inhibition de l'effet cytopathogène ( ECP) :

###### a) Principe :

La présence d'un virus cytopathique peut être décelée par sa capacité à former des syncytia *in vitro* [17]. Cet ECP se traduit par l'apparition de cellules géantes multinucléées qui meurent à court terme. Ces modifications cellulaires sont facilement observables au microscope optique. Le but de ce procédé est de mesurer la capacité des composés à inhiber l'effet cytopathogène induit par les rétrovirus.

###### b) Méthodologie :

Une quantité définie de cellules permissives sont mises en culture sur microplaques puis infectées. Elles sont ensuite mises en contact avec la molécule testée à différentes concentrations. Parallèlement est réalisé un témoin négatif non infecté. Après quelques jours d'incubation à +37°C, durée nécessaire à l'apparition de l'ECP, on détermine pour quelle concentration minimale de composé une inhibition de l'ECP est obtenue.

L'inhibition étant dose-dépendante, ce procédé établit une comparaison de l'activité des inhibiteurs sur la multiplication virale d'un rétrovirus donné. Par exemple, pour le HIV, une étude a montré qu'un nouveau composé, le HOE/BAY946 (polyxylane sulfaté) inhibait la formation de l'ECP induit *in vitro* par le HIV à une dose de 25 µg/ml alors qu'une concentration supérieure à 100 µg/ml de sulfate de dextran était nécessaire. [18]

Par extrapolation, en fixant comme postulat que la toxicité d'un composé dépend de sa dose, cette étude assure la sélection de molécules inhibitrices actives à faible concentration . [19] Les résultats encourageants du HOE/BAY946 ont autorisé une évaluation approfondie de son activité. Elle a aujourd'hui atteint le cap des essais cliniques.

### c) Les limites de cette technique.

- Cette technique détermine seulement la capacité d'une infection par un rétrovirus à induire la fusion de cellules exprimant un récepteur de surface adéquat.

- L'effet cytopathogène dépend de facteurs viraux mais aussi cellulaires difficilement maîtrisables.

- Il ne témoigne pas toujours de la production par la cellule de virus infectieux. Il a été démontré [20], dans le cas du HIV, que la transfection dans des cellules T non infectées d'un plasmide exprimant la gp120 induisait un ECP et un certain degré de mort cellulaire.

### 4-2) Titrage des particules infectieuses :

Ces techniques permettent de mesurer la capacité d'un composé X à empêcher la production de particules virales infectieuses. Ces tests s'effectuent sur microplaques.

#### a) Dénombrement des unités infectantes par la méthode des plages :

Cette méthode consiste à inoculer le tapis cellulaire avec un volume donné de dilutions croissantes d'une préparation virale. Après une durée déterminée d'incubation à 37°C, l'inoculum est rejeté et les cellules sont recouvertes d'un milieu nutritif gélifié : l'infection ne peut alors se propager que de cellule à cellule. Il apparaît des plages de lyse cellulaire, observables macroscopiquement soit directement, soit après coloration. La quantité d'unités virales formant des plages (UFP) est dénombrée.

#### b) Détermination de la dose infectante efficace à 50 % = DI50 [21]

Les dilutions du virus sont inoculées aux cellules cultivées dans les puits de la microplaque. Après inoculation, on détermine le pourcentage de cultures présentant un effet cytopathique visible. La dilution pour laquelle 50 pour 100 des cellules sont détruites correspond à une dose infectieuse 50 % (DI50). Celle-ci est calculée par application de la formule de Kärber (cf. Exemple 45).

Dans le cadre de l'étude de l'activité des antirétroviraux, on s'intéresse à la variation de la DI50 lorsque les cellules sont en contact avec une molécule inhibitrice. Le fait que ce procédé s'opère sur microplaques permet une étude en parallèle avec l'inhibition de l'ECP induite par le composé testé. Tel est le cas lors de l'étude de l'inhibition de l'HIV par le Phosphonoformate. [12] Le mode opératoire et les résultats sont schématisés sur le tableau III

Tableau III : Inhibition de l'ECP par le phosphonoformate

|     |   | Jour de culture |   | 3 | 6 | 9   | 12  | 15 |
|-----|---|-----------------|---|---|---|-----|-----|----|
| ECP | ⊙ | -               | - | - | + | +   | +   | ++ |
|     | △ | -               | - | - | - | +/- | +/- | ++ |
|     | ■ | -               | - | - | - | -   | -   | -  |

Légende :

- ⊙ : culture sans PFA
- △ : culture avec 132  $\mu$ M de PFA
- : culture avec avec 680  $\mu$ M de PFA

Les essais sont réalisés en triple. Pour l'ECP, (+/-) correspond à 1 des 3 cultures positives, (+) lorsque toutes les cultures sont positives.

A la fin de l'expérience, les DI50 sont calculées. Pour les cultures non traitées, elle est de  $4 \times 10^3$  DI50/ml. Pour les cultures avec 132  $\mu$ M de PFA, elle est de  $0,4 \times 10^3$  DI50/ml. Enfin pour celles dont la concentration en Phosphonoformate est de 680  $\mu$ M la DI50 n'est pas mesurable.

Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation entre le degré d'inhibition et la valeur de la DI50.

Calcul du titre infectieux par application de la formule de Kärber [15]

Formule de Kärber :

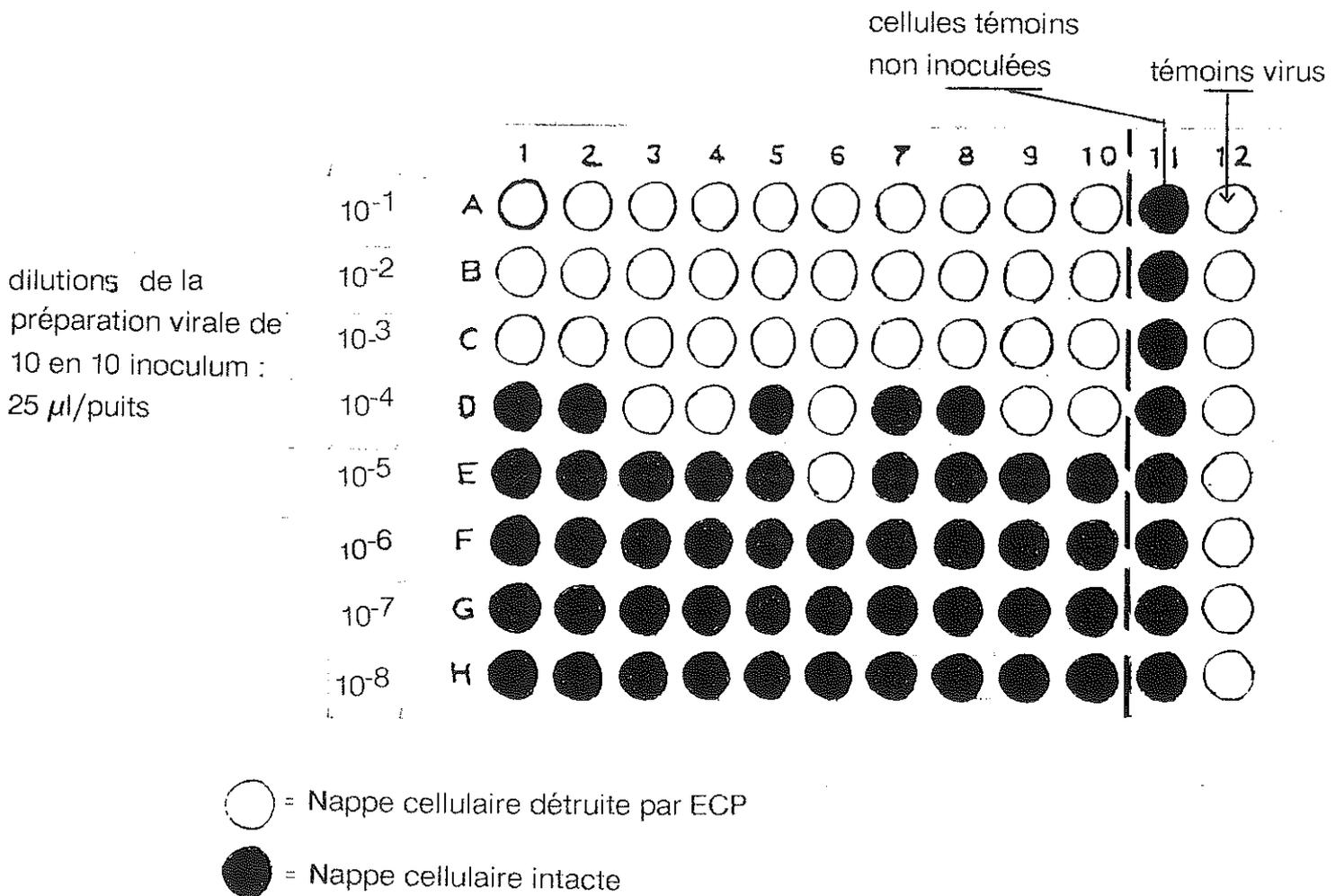
$$\log \text{ de DI}_{50} = l + d (S - 0,5)$$

$l = \log_{10}$  de la 1ère dilution

$d = \log_{10}$  du facteur de dilution

$S =$  somme des pourcentages des tubes de cellules infectées à chaque dilution.

Exemple : [15]



| Dilution<br>du virus | Proportion<br>des tubes infectés |
|----------------------|----------------------------------|
| $10^{-1}$            | 10/10 = 1                        |
| $10^{-2}$            | 10/10 = 1                        |
| $10^{-3}$            | 10/10 = 1                        |
| $10^{-4}$            | 5/10 = 0,5                       |
| $10^{-5}$            | 1/10 = 0,1                       |
| $10^{-6}$            | 0/10 = 0                         |
| $10^{-7}$            | 0/10 = 0                         |
| $10^{-8}$            | 0/10 = 0                         |

$$\log \text{DI}_{50} = 1 + 1 (1 + 1 + 1 + 0,5 + 0,1 - 0,5) = 4,1$$

$$\text{Soit le titre du virus} = 10^{4,1} \text{ DI}_{50} \text{ par } 25 \mu\text{l}$$

$$= 4 \times 10^{5,1} / \text{ml}$$

## **V. MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE VIRALE :**

### **1°) Mesure de l'activité transcriptase inverse:**

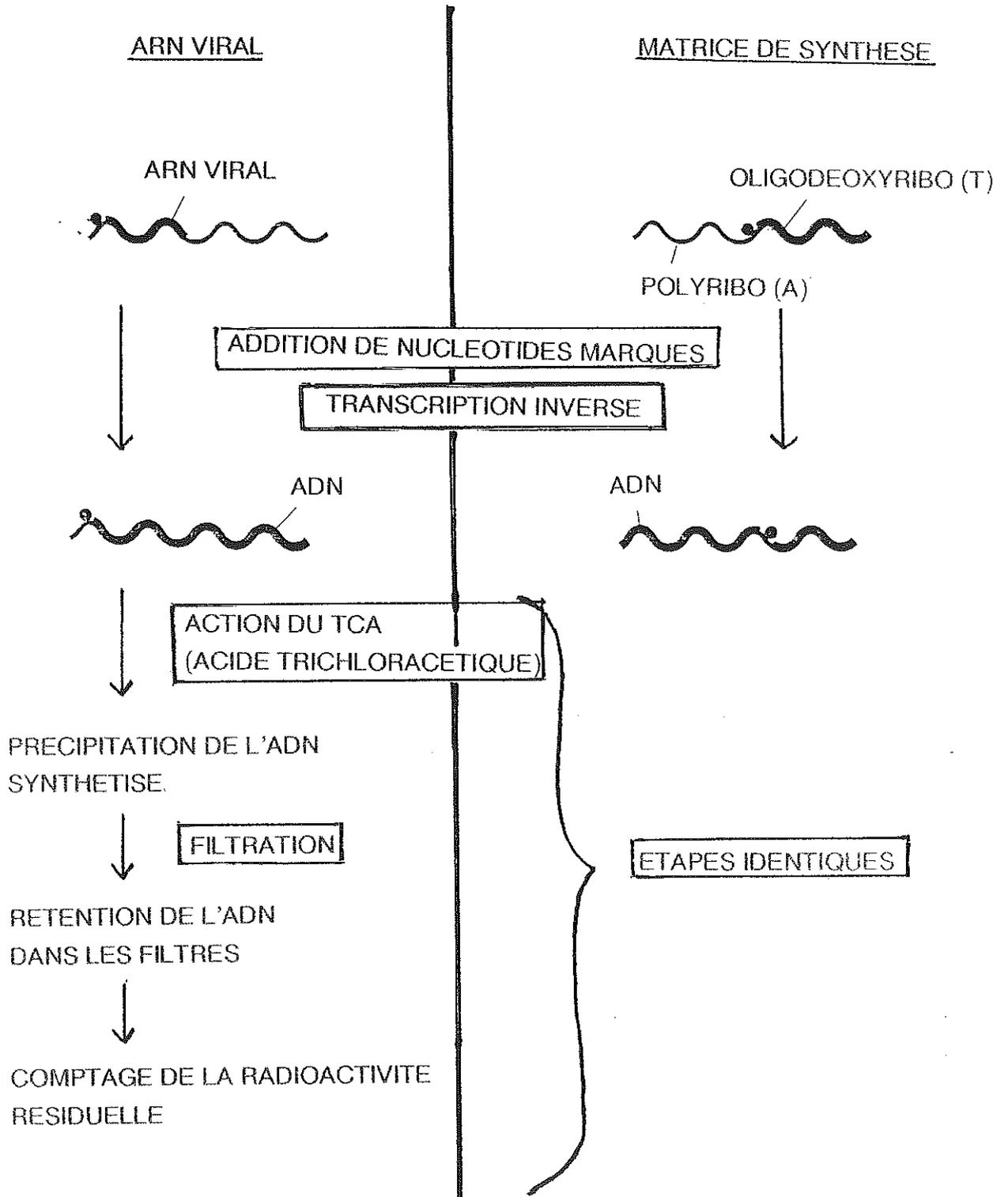
#### 1-1) Principe :

##### 1-1-1) Description de la méthode : (cf.Schéma VIII).

Le principe du dosage est basé sur la capacité de l'enzyme à synthétiser une molécule d'ADN à partir d'une matrice, soit naturelle l'ARN viral, soit synthétique. La TI isolée du surnageant cellulaire reconnaît l'amorce et copie l'ARN en incorporant des nucléotides marqués. L'ADN synthétisé est précipité par l'acide trichloracétique (TCA), puis récupéré par filtration de la solution acide. La radioactivité résiduelle contenue dans les filtres est alors comptée.

Schéma VIII : Principe du dosage de l'activité de la transcriptase inverse

MATRICES  
UTILISEES :



### 1-1-2) Les réactifs :

Ils sont au nombre de huit (cf. Tableau IV). Le premier réactif nécessaire avant le dosage est le détergent qui scinde la particule virale libérant ainsi l'enzyme. Les autres réactifs peuvent être divisés en deux catégories :

- Les réactifs réagissant les conditions biochimiques du fonctionnement de l'enzyme : réactifs de première catégorie.
  
- Les réactifs déterminant le type de dosage : réactifs de seconde catégorie.

Les rôles des réactifs de première série sont les suivants : Un agent chélateur, un agent stabilisant et des cations mono et bivalents stabilisent l'enzyme ; le tampon TrisHCl permet l'équilibrage du PH et l'agent réducteur augmente la sensibilité de la réaction en protégeant la TI de l'oxydation.

Les réactifs de deuxième catégorie comportent le substrat marqué et le modèle amorce. Le nucléotide radioactif le plus fréquemment employé est la désoxythymidine marquée au tritium ( $[^3\text{H}]$  d TTP). Lorsque l'origine de l'enzyme est le surnageant de cultures cellulaires sur microplaques, la désoxythymidine marquée au phosphore ( $[^{32}\text{P}]$  d TTP) est préférentiellement utilisée : ce radioélément très énergétique permet de déceler de faibles activités virales. Le choix du modèle détermine l'activité enzymatique étudiée : l'ARN viral ainsi que les modèles amorces synthétiques de type polyribonucléotidique ( poly (rA)-oligo (dT), poly (rC)-oligo (dG)) permettent de doser l'activité ADN polymérase - ARN dépendante ; les polynucléotides de type ADN (poly (dA)-oligo (dT)) détectent l'activité ADN polymérase - ADN dépendante et les modèles amorces hybridés ADN - ARN dosent l'activité RNase de la transcriptase inverse.

Tableau IV : Les réactifs communs à tous les tampons réactionnels. [22]

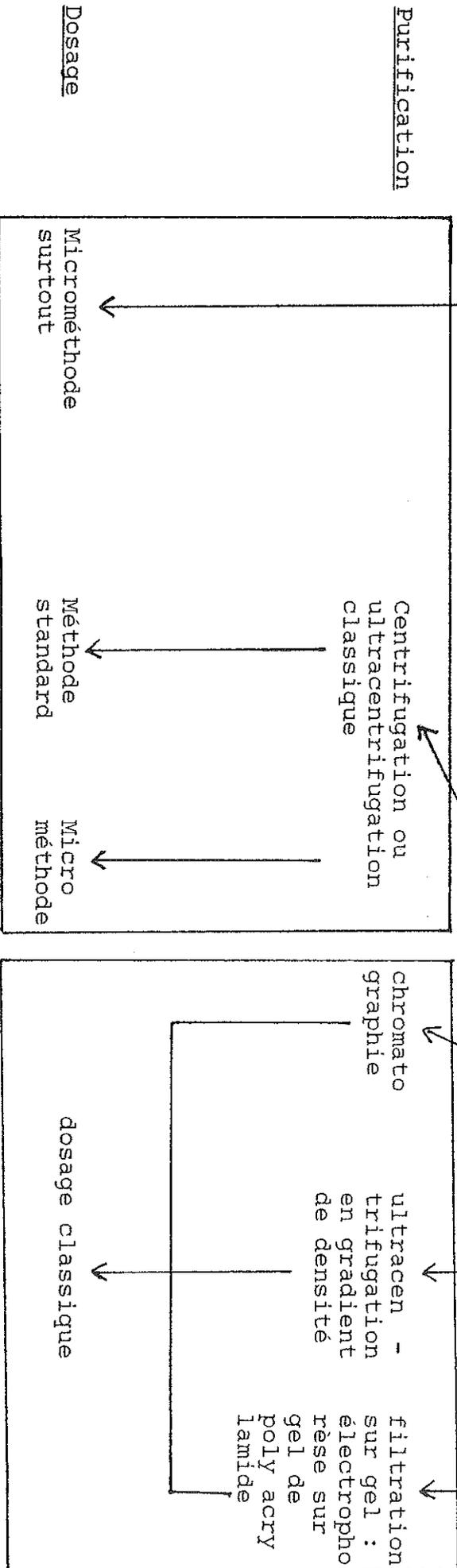
|                   |  |
|-------------------|--|
| Cation monovalent | KCl  |
| Cation bivalent   | MgCl <sub>2</sub> ou MnCl <sub>2</sub>   |
| Tampon triS HCL   | PH 7,8 à 8,2   |
| Agent réducteur   | DTT (Dithiothreitol)<br>ou<br>GSH (glutathion réduit.)   |
| Agent chélateur   | EGTA (Acide tétracétique<br>d'éthylène glycol)<br>ou<br>EDTA (Acide tétracétique<br>d'éthylène diamine)        |
| Agent stabilisant | BSA (bovine sérum albumin)<br>ou<br>Glycérol<br>ou<br>EG (Ethylène glycol)                                     |
| Détergent         | Triton X-100<br>ou<br>Nonidet P40  |
| Substat marqué    | [ <sup>3</sup> H] dTTP ou [ <sup>32</sup> P] dTTP  |
| Modèle amorce     | Poly (rA) oligo (dT) <sub>12-18</sub><br>ou<br>Poly (rC) oligo (dG) <sub>12-18</sub><br>sont les plus courants |

## **1-2) Les méthodologies utilisées dans les laboratoires : (Schéma IX)**

Elles se différencient par leur durée. Le premier protocole (protocole A) nécessite des purifications enzymatiques très poussées assurant ainsi une meilleure connaissance du mécanisme et du niveau d'action des antirétroviraux. Le second protocole (protocole B) , basé sur la purification par ultracentrifugation, correspond à des tests aujourd'hui très automatisés et dont la rapidité permet l'évaluation en série de l'effet inhibiteur de nombreuses molécules.

A partir de TI synthétique

A partir de surnageant cellulaire



Protocole B :

recherche empirique, en aveugle d'activités antirétrovirales

Protocole A :

recherche plus rationnelle : permet l'étude du mécanisme d'action des antirétroviraux.

Schéma IX : Les différents protocoles de dosage de la transcriptase inverse.

## **1-2-1) Le protocole A : Purification de la TI :**

### **a) Intérêts :**

Ce protocole permet d'une part d'analyser le mécanisme de transcription inverse, d'étudier la cinétique de la réaction et d'autre part, de séparer les différentes formes actives de l'enzyme. La mise au point d'inhibiteurs plus spécifiques est ainsi rendue possible.

### **b) Techniques de purification :**

#### **b-1) L'électrophorèse sur gel :**

##### **b-1-1) Principe : [23]**

Le principe de l'électrophorèse est fondé sur la migration de particules chargées, sous l'influence d'un champ électrique, sur un gel type SDS - PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Il assure la séparation des protéines (donc les différents constituants d'une enzyme) et la détermination des masses de chaque fraction séparée.

Le SDS ajouté à un solvant dénature et se combine avec les protéines, qui migrent comme des anions. Le nombre de charges est proportionnel au nombre de molécules de détergent (SDS) fixé et donc à la masse de la molécule protéinique. Les bandes séparées sont révélées par autoradiographie.

##### **b-1-2) Procédure d'analyse sur gels de F. Lori : [24]**

L'auteur s'est proposé de séparer les différentes protéines constituant la transcriptase inverse du HIV -I et de calculer l'activité enzymatique de chacune d'entre elles. Il a aussi réalisé des études de cinétique, à partir d'extraits cellulaires obtenus après différents temps d'infection, par le virus, identifiant ainsi les formes actives de l'enzyme.

Trois bandes électrophorétiques ont été révélées pour la TI du HIV : 2 bandes majeures de 65 et 51 kilodaltons (kD), une bande de 165 kD représentant 2 à 4 % de l'activité totale. Lors de la maturation du virus dans les cellules infectées, la bande 66 kD croît en intensité entre la 70ème et 120ème heure après l'infection, alors

que la bande 165 kD reste constante et que la 51 kD ne peut être visualisée. Les bandes 66 kD et 165 kD sont les formes actives de la TI du lentivirus humain. La p 51 n'a pas d'activité polymérasique.

En conclusion, cette technique peut permettre d'identifier et d'analyser toute activité d'ADN polymérase par inhibition avec le compétiteur adéquat.

### Procédure d'analyse sur gel de F. Lori [22]

| TAMPON D'EXTRACTION = A   | TAMPON DÉNATURANT = B  | TAMPON DE RENATURATION = C                       |
|---|--|--|
| 100 mM Tris. HCl pH 7,8<br>0,2 % Triton X-100<br>200 mM de KCl<br>4 mM de DTT<br>1 mM de PMSF | 65 mM Tris. HCl pH 7,5<br>1 % SDS<br>65 mM 2-mercaptoéthanol<br>10 % glycérol<br>0,01 % bleu bromophénol | 50 mM Tris. HCl pH 7,8<br>3 mM 2-mercaptoéthanol |

#### PROTOCOLE

##### 1. Extraction

VIH purifié + tampon A  
incubation de 15 mn à + 4 °C

##### 2. Dénaturation

10 µl d'extrait viral + 5 µl de tampon B  
incubation pendant 3 mn à 37 °C

##### 3. Electrophorèse sur gel SDS (45 V pendant 30 minutes)

(7,5 % acrylamide ± 20 µg/ml de modèle-amorce)  
poly(rA)-oligo(dT)<sub>15</sub> ou poly(rC)-oligo(dG)<sub>15</sub>

##### 4. Renaturation

laver en tampon de renaturation pendant 1 h

##### 5. Essai enzymatique in situ

incubation pendant 30 mn à la température du laboratoire  
avec 5 ml mélange réactionnel  
(50 mM Tris. HCl pH 7,8 + 10 mM MgCl<sub>2</sub> ou 1 mM MnCl<sub>2</sub> + 2 mM DTT + 20 mM KCl)  
incubation pendant 1 h à 37 °C avec le mélange réactionnel  
contenant 10 µCi/ml [<sup>32</sup>P] dNTP

##### 6. Révélation

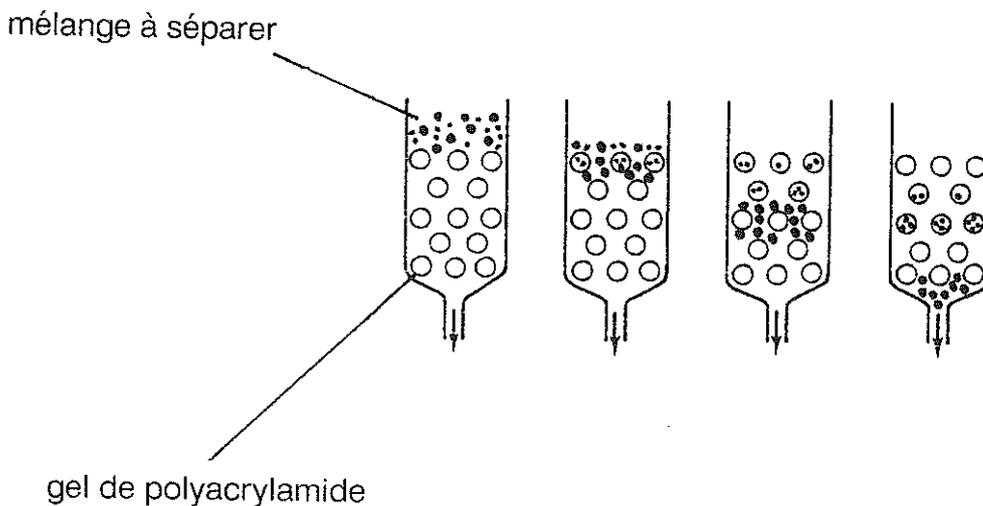
lavage du gel en TCA 5 % froid + 1 % pyrophosphate de sodium  
séchage  
autoradiographie

## b-2) Chromatographie :

La séparation des constituants de la transcriptase inverse est fonction de leur taille respective (chromatographie d'exclusion sur gel) ou de leur charge électrique (chromatographie sur résine échangeuse d'ions).

### b-2-1) Chromatographie d'exclusion sur gel :

#### b-2-1-1) Principe :



Le gel (polymère glucidique hydraté d'Agar ou Agarose, de Séphadex ou Sépharose) est constitué de billes à structure réticulée, dont les mailles ont une dimension connue. Les molécules les plus petites diffusent dans le réseau du gel alors que les plus volumineuses s'échappent par de larges canaux intergranulaires. Les molécules de faible encombrement sont donc ralenties alors que les grosses molécules sont exclues.

#### b-2-1-2) Exemple : [25]

Pour cette technique, on procède à une incubation préalable de la TI du virus AMV (Avian Myeloblastis Virus) avec un composé antiviral l'isoniazide (INH) à une concentration de 25  $\mu\text{M}$  et 250  $\mu\text{M}$ . Préalablement, l'INH a été complexé avec des ions cuivriques qui jouent le rôle de marqueur. Le complexe formé TI inhibiteur est ensuite séparé par chromatographie (le gel utilisé est du Séphadex et le tampon d'élution est constitué par le mélange réactionnel classique supplémenté par du glycérol). Pour chaque fraction collectée l'activité polymérisique est détectée. La

teneur en cuivre est aussi mesurée à 3242 Å avec un spectrophotomètre d'absorption atomique.

Les résultats obtenus ont montré que le complexe exerçait son effet inhibiteur sur l'activité polymérique de la TI et que cet effet était dose-dépendant. L'étude spectrophotométrique apporte les renseignements suivant :

- A 25  $\mu\text{M}$ , les pics obtenus en analyse spectrophotométrique se confondent avec ceux observés lors de la chromatographie. La liaison Enzyme INH  $\text{Cu}^{2+}$  est totale.

- A 250  $\mu\text{M}$ , il apparait un pic surnuméraire correspondant à une fraction inhibiteur - ions cuivriques non liée à l'enzyme : la liaison Enzyme - Complexe est incomplète.

En conclusion, ce procédé utilisant un inhibiteur "marqué" par des ions cuivriques permet d'étudier l'activité inhibitrice de l'enzyme liée avec le composé testé et d'analyser le type de liaison qui se crée entre ceux-ci par la détermination du taux de cuivre à l'aide d'un spectrophotomètre. Le facteur limitant de cette expérimentation repose sur la capacité de la molécule à tester, à se complexer avec les ions cuivriques.

### b-2-2) Chromatographie sur résine échangeuse d'ions

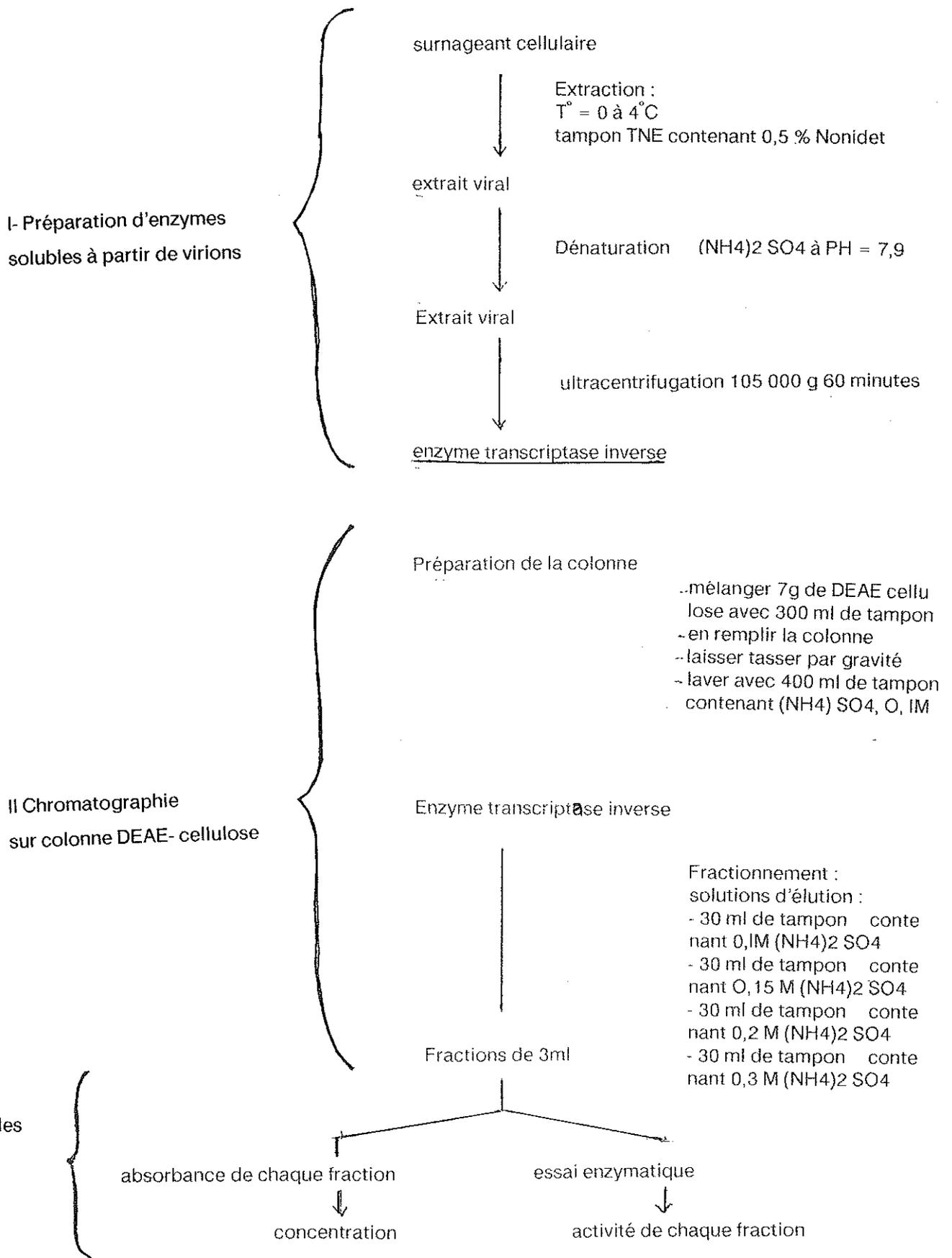
#### b-2-2-1) Principe :

Les molécules sont séparées en fonction de leur charge électrique de surface. La surface des particules virales présentent des variations de charge électrique en fonction du PH et de la concentration ionique du milieu. Dans un premier temps, les particules se fixent, sous l'action des forces électrostatiques sur une colonne de résine (type DEAE - cellulose) ; puis elles sont relarguées sélectivement en fonction des variations de PH et de la concentration ionique du liquide d'élution qui traverse la colonne.

#### b-2-2-2) Séparation des constituants de la TI du VISNA par chromatographie sur DEAE - cellulose :

Le schéma X présente les différentes étapes , les caractéristiques des réactifs et les paramètres intervenant dans cette expérimentation. En résumé, le protocole consiste à extraire la transcriptase inverse du VISNA, à la soumettre à une chromatographie sur résine échangeuses d'ions (DEAE - cellulose) puis à mesurer l'activité transcriptase inverse et l'absorbance à 280 nm de chaque fraction collectée.

**SCHEMA X : ETAPES CHRONOLOGIQUES [26]**



Grâce à cette technique, trois fractions ont ainsi été séparées : une première de poids moléculaire de 125 000 représentant 72 % de l'activité enzymatique totale, une seconde de PM de 18 000 ayant une activité TI de 25 % et une fraction résiduelle dont l'activité par rapport à l'activité totale est de 3 %.

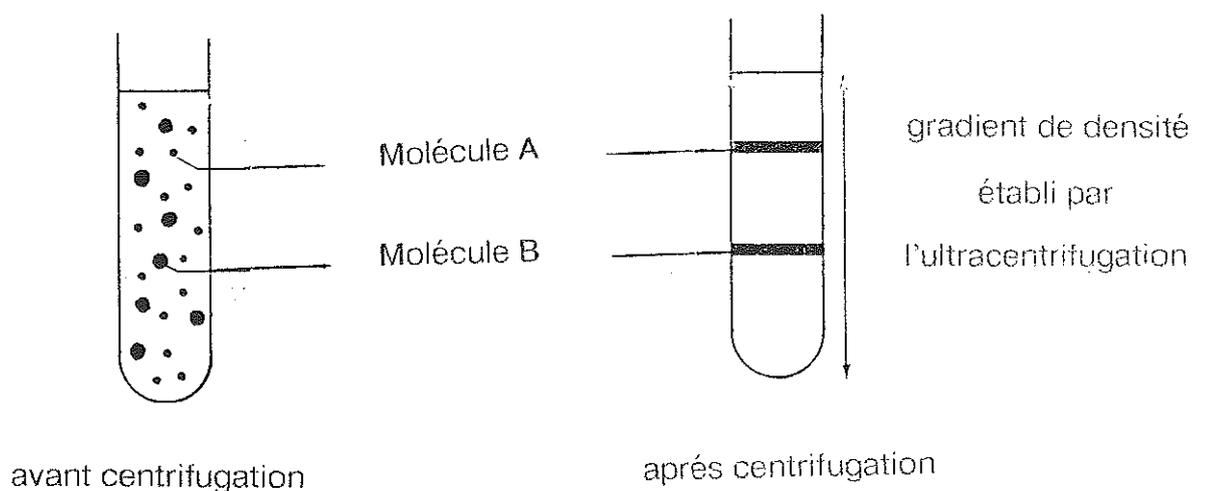
En conclusion, ce procédé isolant les constituants de la transcriptase inverse permet d'étudier l'activité de chaque fraction en fonction de l'addition d'inhibiteurs. Des inhibitions très spécifiques peuvent ainsi être décelées.

### b-3) - L'ultracentrifugation en gradient de densité :

#### b-3-1) - Principe :

Le surnageant viral clarifié par centrifugation est mélangé avec un sel (chlorure de césium). Ce sel établit spontanément dans le tube de centrifugation un gradient de densité sous l'influence du champ gravitationnel. Chaque particule virale s'immobilise dans la région du gradient correspondant à sa densité formant ainsi des bandes distinctes (schéma XI). Après ultracentrifugation, chaque bande peut être prélevée.

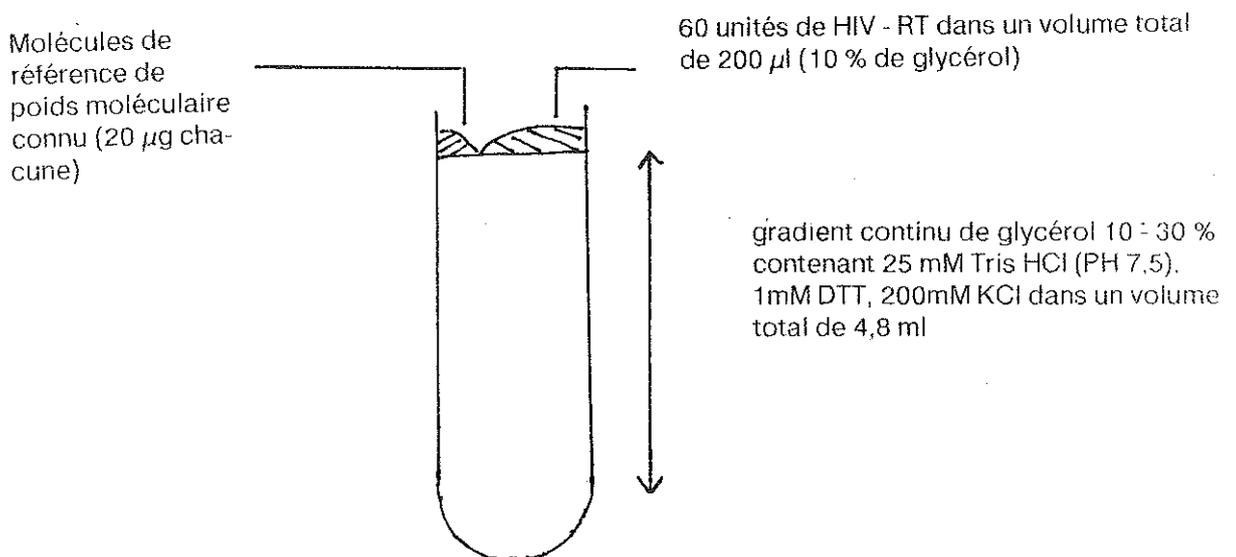
Schéma XI : représentation de la répartition de particules de densité différentes au cours d'une ultracentrifugation à l'équilibre en chlorure de césium.



### b-3-2) - Application à la TI du HIV [27]

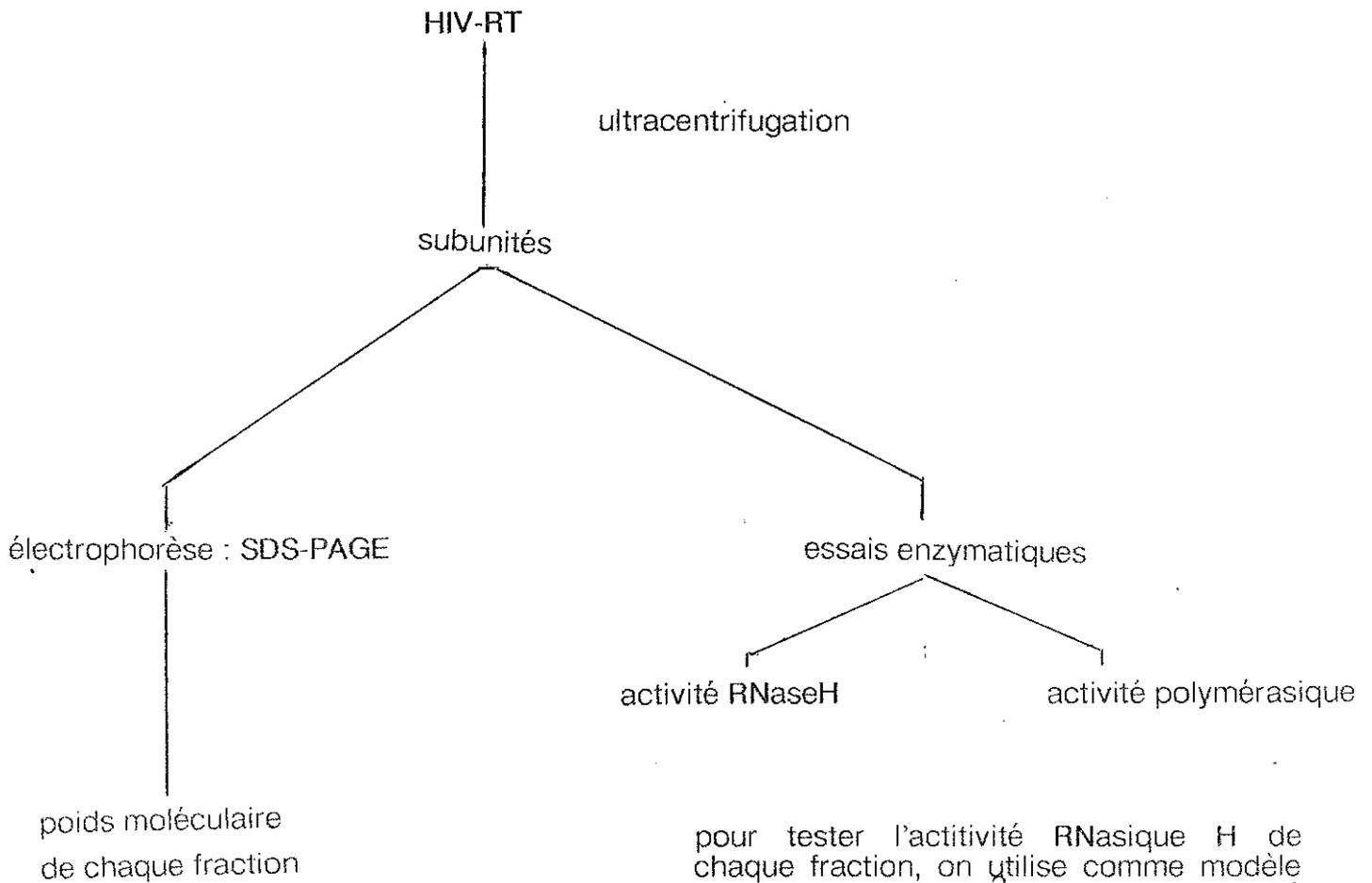
La TI du HIV est soumise à une ultracentrifugation dans un gradient continu de glycérol (schéma XII et XIII). Les bandes résultantes sont isolées puis leurs activités polymérasique et RNAsique H sont mesurées avec les modèles amorces appropriés (poly (rA)-oligo (dT) pour l'activité polymérasique et poly (dC) - [3H] poly (rG) pour l'activité RNAsique H). Parallèlement, les positions des molécules standard (de poids moléculaire connu) sont identifiées par SDS-PAGE [28] puis révélées par du bleu de coomasie [29], ce qui permet de déterminer le poids moléculaire de chaque fraction issue de la TI.

Schéma XII : Protocole de l'ultracentrifugation en gradient de densité [27]



légende : le schéma récapitule les conditions expérimentales de l'ultracentrifugation. Elle se déroule à +4°C pendant 20 heures et à 40 000 rpm (Beckmanm SW50 - 1 rotor).

### Schéma XIII : Etapes de l'étude de la HIV-RT



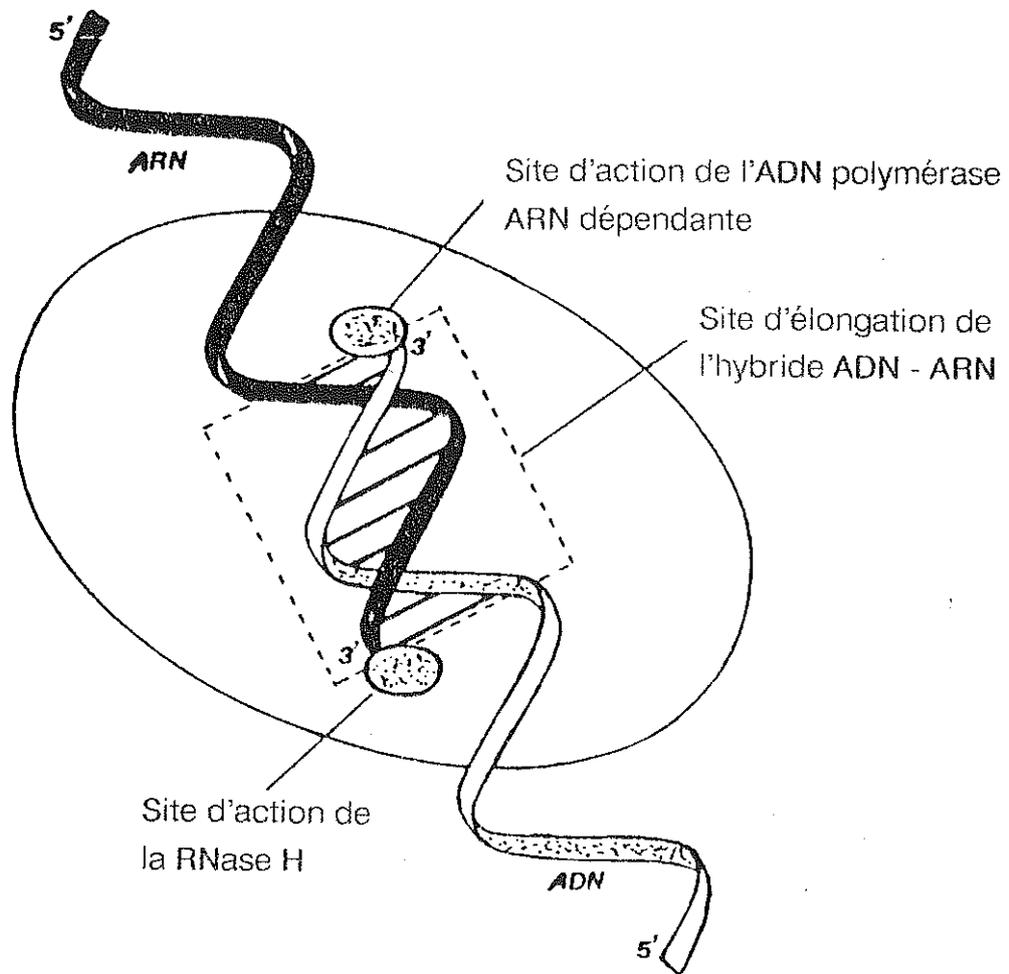
pour tester l'activité RNasique H de chaque fraction, on utilise comme modèle amorce le poly(dC)-[<sup>3</sup>H]poly(rG). L'activité polymérasique est détectée par l'emploi du poly (rA)-oligo(dT).

Pour chaque fraction, on determine le degré d'activité en faisant varier les concentrations des réactifs composant le mélange réactionnel pour déterminer pour chacune d'entre elles les conditions optimales de fonctionnement.

Les résultats enregistrés confirment ceux obtenus précédemment lors de l'électrophorèse sur gel de la TI du HIV. Cette enzyme se compose de polypeptides : p165, p66, p51. Les subunités p66 et p51 sont présentes dans le complexe enzymatique dans des proportions équivalentes et actives indépendamment l'une de l'autre[30]. Il a été démontré que le polypeptide 51 dérive d'un clivage protéolytique de p66, et que p51 et p66 possèdent des acides aminés identiques[31-32]. Grâce à ces deux découvertes, on a émis l'hypothèse que la forme naturelle initiale de l'enzyme serait un dimère p66-p51. Un modèle schématique de reverse transcriptase a ainsi pu être établi (schéma XIV).

En conclusion, ce type d'essai apporte une meilleure connaissance des constituants de la TI du HIV. Il permet de mieux individualiser les sites actifs de cette enzyme, ouvrant la voie à la découverte de nouvelles cibles pour la chimiothérapie antirétrovirale.

schéma XIV : un modèle possible de reverse transcriptase



légende : L' ADN polymérase-ARN dépendante est localisée à l'extrémité 3' du brin d'ADN naissant. Le site actif de la RNase H est localisé sur l'hybride ARN-ADN à une distance d'environ 10 paires de bases (1 tour d'hélice) du site actif polymérasique. Cette distance est relativement stable. Ainsi ce modèle permet de mieux définir les cibles potentielles des inhibiteurs de la réplication.

## 1-2-2). Protocole B : Mesure de l'activité transcriptase inverse.

### a) - Obtention de l'enzyme rétrovirale :

Le moyen le plus usité est la culture cellulaire du fait de son coût relativement faible. Cependant, ce procédé est long (pour HIV1, HIV2, de 7 à 28 jours avant que le surnageant cellulaire contienne suffisamment d'enzyme ; pour le HTLV-I jusqu'à 12 semaines). Le rendement est faible. De plus, ce n'est pas une indication quantitative de la présence de virus infectieux : une publication récente fait état d'une suppression possible de l'activité transcriptase inverse par un mycoplasme contaminant la culture [34]

L'enzyme peut aussi être synthétisée à partir de son gène cloné (cas du HIV [7]) ou à partir de recombinants d'*Escherichia coli* [6,8,9]. Cette voie synthétique met à la disposition des chercheurs de grandes quantités d'enzymes nécessaires à une étude empirique d'activités inhibitrices. Néanmoins elle n'assure pas une évaluation concomitante de la cytotoxicité des produits actifs et n'intègre pas non plus les activations métaboliques cellulaires subies par certains composés. Citons, par exemple, l'AZT qui doit être phosphorylé grâce aux enzymes cellulaires pour devenir actif sur la transcriptase inverse.

### b) Protocole expérimental :

L'extraction préalable par ultracentrifugation (centrifugation à très haute vitesse) demeure indispensable lorsque l'enzyme provient du surnageant cellulaire. La transcriptase inverse est extraite des particules virales composant le culot de centrifugation grâce à un tampon contenant un détergent (Triton X-100 ou Nonidet P-40) dont le rôle consiste à scinder le core du virus et libérer l'enzyme.

Pour le dosage proprement dit, le mélange réactionnel comprend un cation monovalent (KCl), un cation divalent ( $MgCl_2$  ou  $MnCl_2$  suivant le virus considéré), un modèle amorce, un <sup>tampon</sup> TrisHCl de PH déterminé, un agent réducteur (dithiothréitol : DTT), un substrat marqué et un agent stabilisant. L'addition de la transcriptase inverse déclenche la réaction. La durée et la température d'incubation varient suivant le rétrovirus considéré. La réaction enzymatique est stoppée par une solution d'arrêt à base d'acide trichloracétique. Le matériel radioactif précipité est collecté sur des filtres. Ils sont séchés puis mis en présence de liquide scintillateur pour le comptage de la radioactivité.

### c) Les différentes méthodes de dosage.

Nous avons choisi de présenter des méthodologies d'approches différentes permettant la détection et l'isolement de la transcriptase inverse d'un lentivirus humain (HIV) et de deux rétrovirus animaux, l'un aviaire (AMV) et l'autre murin (MuMLV) (cf Tableaux V, II, III).

#### c-1) Comparaison des réactifs (tableau VIII) :

Nous allons comparer les concentrations des réactifs pour quatre rétrovirus : deux lentivirus (HIV, un lentivirus du mouton : le VISNA), un virus leucémogène murin (MuMLV) et un virus aviaire (AMV).

Quel que soit le rétrovirus étudié, il est établi que le modèle amorce idéal pour le dosage de l'activité polymérasique est le poly (rA) - oligo (dT). [35.36]. La concentration de ce modèle amorce doit être en rapport avec celle du substrat marqué ce qui explique que pour le Mu MLV, vu la faible dose de modèle amorce, le substrat marqué choisi soit le  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dTTP, radioélément plus énergétique que le [<sup>3</sup>H]dTTP.

Il existe une sélectivité plus ou moins marquée des rétrovirus pour le cation divalent. L'ensemble des rétrovirus humains (HIV1, II et HTLV1, II) fonctionne exclusivement avec l'ion  $Mg^{2+}$  [37-22] (Tableau II). Le VISNA et l'AMV emploient préférentiellement le cation  $Mg^{2+}$  [22]. Certains protocoles permettant l'analyse de l'activité TI du Mu-MLV utilisent le cation  $Mg^{2+}$  (tableau VII).

Le tampon TrisHCl assure le maintien d'un PH adapté au virus étudié. Le PH est en effet un des facteurs primordiaux pour qu'une enzyme puisse agir *in vitro*. Comme le montre le tableau VIII, les PH sont tous basiques. Le PH optimum est de 8 pour le HIV et de 8,3 pour le Mu-MLV, le VISNA et l'AMV. Un écart de plus ou moins 0,2 entraîne une inhibition de l'activité transcriptase inverse du HIV [22]. Cependant, ces PH optimaux ne reflètent que les conditions de dosage de l'activité enzymatique globale de la transcriptase inverse. Des études font état de légères variations des PH optimaux pour les différents constituants de la TI du VISNA et du HIV [27].

Comme pour les autres réactifs, la concentration en détergent dépend du rétrovirus étudié.

Pour le HIV et le Mu-MLV, elles sont plus faibles que pour le VISNA et l'AMV. Les virus HIV et MuMLV apparaissent donc plus sensibles au détergent : leurs couches lipidiques exigent une concentration moindre en détergent.

Les concentrations des derniers constituants du mélange réactionnel (agent réducteur, cation monovalent) ont un rôle secondaire. Elles varient d'une méthode de dosage à une autre pour un même rétrovirus prouvant ainsi que des écarts de concentrations n'entraînent pas forcément des inhibitions. Par exemple, pour le HIV, une inhibition de la TI est observée à une dose en KCl supérieure à 250 mM alors que la concentration optimale est de 150 mM [22]. De plus, pour le MuMLV, le KCl peut être remplacé par du NaCl (tableaux VI et VII). Il n'y a donc pas de sélectivité des rétrovirus pour ces éléments : on peut employer indifféremment du DTT ou du GSH, du KCl ou du NaCl.

#### c-2) Comparaison des conditions expérimentales : température, temps d'incubation.

La température intervient à trois niveaux : lors du mélange réactifs-transcriptase inverse, lors du déroulement et de l'arrêt de la réaction enzymatique. Dans tous les cas décrits, la mise en contact de l'enzyme et du mélange réactionnel ainsi que l'arrêt de la réaction ont lieu entre 0 et +4° C. La température d'incubation est plus variable : elle peut être de 41° C pour le VISNA [38] et comprise entre 30° et 41° C pour le HIV [39] sans qu'une inhibition de l'activité soit enregistrée. Par commodité, la température physiologique (37° C) reste la plus employée (tableaux V, VI, VII).

Le temps d'incubation varie d'un rétrovirus à un autre et aussi d'une méthode de dosage à l'autre pour un même virus (tableaux V, VI, VII). En fait, la variation de la durée d'incubation sert de base dans l'étude de la cinétique de l'activité transcriptase inverse.

#### c-3) Comparaison méthode standard - microméthode :

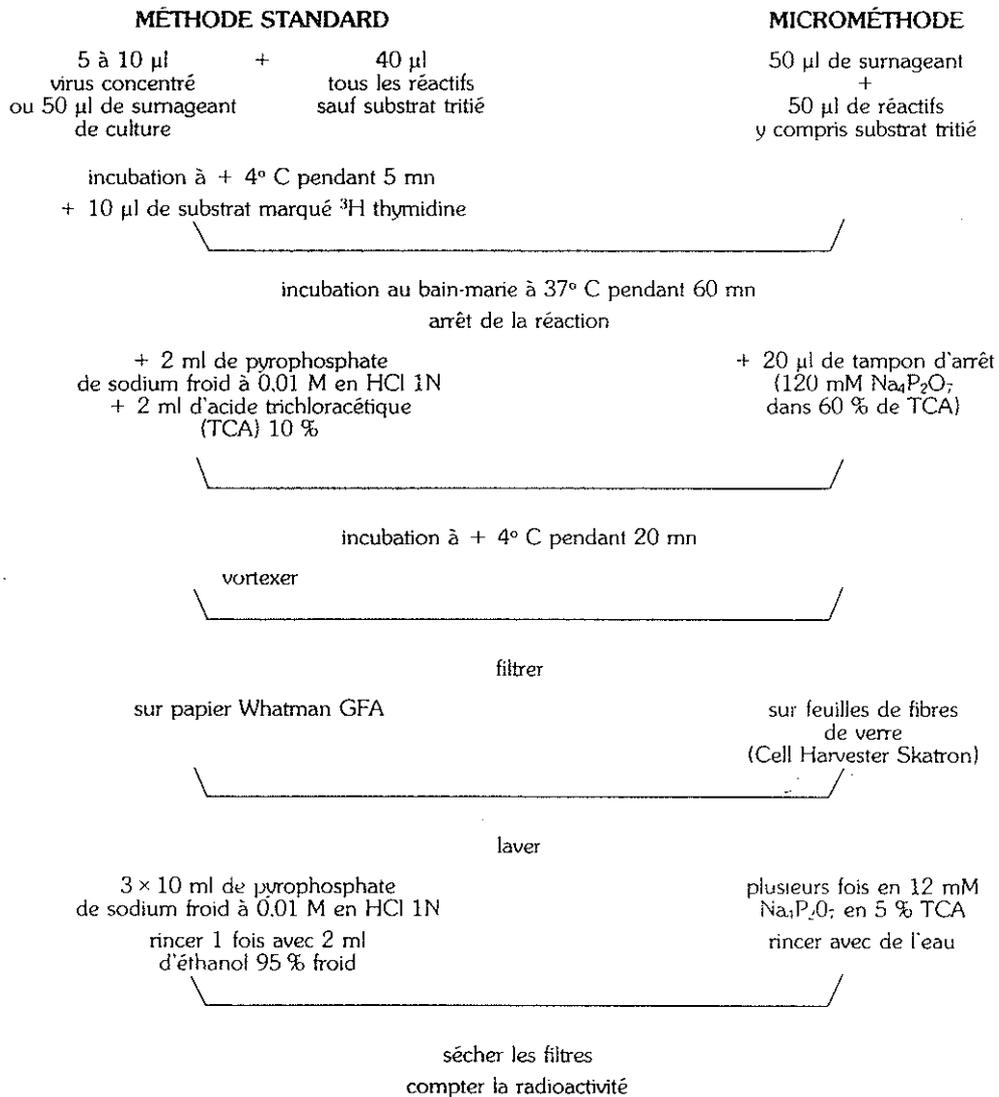
Certains auteurs se sont intéressés aux résultats obtenus avec une méthode standard et une microméthode pour le dosage de l'ATI (activité transcriptase inverse) du HIV [40]. Pour ce faire, ils ont testé l'ATI de 4 dilutions virales. Pour chaque dilution, 10 déterminations de l'ATI ont été effectuées par micro et macrométhode permettant ainsi d'établir pour chacune d'elle une valeur moyenne

d'activité et un coefficient de variation des résultats observés. Les coefficients de variation sont sensiblement les mêmes pour les deux méthodes ainsi que la valeur moyenne. Les paramètres différenciant les deux techniques sont le temps nécessaire pour réaliser une série de dosage (tableau IX) et la quantité de réactifs utilisée (tableau X). L'avantage de la microméthode est un gain de temps (plus d'une heure par série de tests) et un gain de réactifs.

Une autre technique plus récente d'essais en microplaques offre un intérêt supplémentaire [41]. Ce nouveau type d'essai utilisant du substrat marqué au phosphore 32 permet d'utiliser très peu de matériel de départ (10  $\mu$ l de surnageant : tableau VI). Néanmoins la manipulation de ce type de radioactivité nécessite des structures et un appareillage importants.

En conclusion, les microméthodes sont aussi fiables que les méthodes standard. Leur principal avantage, outre leur coût en réactifs moins élevé, est de permettre la visualisation du relargage de transcriptase inverse dans un très grand nombre d'échantillons.

**TABLEAU V : Méthode standard et microméthode pour la détection de l'activité de la transcriptase inverse du HIV-[22].**



**TABLEAU VI : Méthode en microplaques de S. Goff.**

Comparaison de microméthodes dosant l'activité transcriptase inverse de deux rétrovirus : le HIV et le virus murin MuMLV [22]

**Pour la détection de rétrovirus**

| <b>murin M-MLV<br/>(original)</b> | <b>humain VIH<br/>(modifié)</b>   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 10 µl de surnageant               | 10 µl de surnageant               |
| + 50 µl tampon contenant          | + 50 µl tampon contenant          |
| - 50 mM Tris. HCl pH 8,3          | - 50 mM Tris. HCl pH 7,8          |
| - 20 mM DTT                       | - 2 mM DTT                        |
| - 0,6 mM MnCl <sub>2</sub>        | - 5 mM MgCl <sub>2</sub>          |
| - 60 mM NaCl                      | - 7,5 mM KCl                      |
| - 0,05 % NP40                     | - 0,05 % NP40                     |
| - 5 µg/ml oligo(dT)               | - 1,57 µg/ml oligo(dT)            |
| - 10 µg/ml poly(rA)               | - 5 µg/ml poly(rA)                |
| - 10 µM α [ <sup>32</sup> P] dTTP | - 0,5 µCi [ <sup>32</sup> P] dTTP |

incubation pendant 45 à 90 mn à 37° C (2 h M-MLV)

déposer 10 µl sur Dot Blotter avec filtre DE81

laver plusieurs fois en NaCl (6 fois 15 mn minimum)

laver en éthanol 95 % (2 fois 5 mn)

sécher

autoradiographier 6 à 16 h

**TABLEAU VII** : Comparaison des deux méthodes de dosage permettant l'analyse de l'ATI de deux rétrovirus : l'AMV et le MuMLV.[42]

| Aviaire (AMV)                           | Murin (MuMLV)                           |
|---|---|
| 2U d'enzyme                             | 1 U d'enzyme                            |
| + 100µl de tampon contenant :           | + 50µl de tampon contenant :            |
| - 0,5 mM d TTP                          | - 1,5 mM d TTP                          |
| - 10µg BSA                              | - 10µg BSA                              |
| - 2µl de 0,5 mM de <sup>[3M]</sup> dTTP | - 2µl de 0,5 mM de <sup>[3M]</sup> dTTP |
| - 50 mM Tris HCl (pH = 8,3)             | - 50 mM Tris HCl (PH = 8,3)             |
| - 40 mM KCl                             | - 75 mM KCl                             |
| - 1 mM DTT                              | - 10 mM DTT                             |
| - 6 mM MgCl <sub>2</sub>                | - 3 mM MgCl <sub>2</sub>                |
| - 1µg de poly (rA) oligo (dT)           | - 1µg poly (rA) oligo (dT)              |

- incubation pendant 10' à 37° C.
- la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de la solution d'arrêt  
(10% TCA ; 0,1 M pyrophosphate de sodium ; 1 mM EDTA ; 10 mM Tris HCl PH 7,5).
- la solution est alors homogénéisée et immergée dans un bain de glace 20 minutes.
- le contenu est filtré avec des filtres en fibres de verre Whatman à l'aide d'une pompe à vide.
- les filtres sont lavés trois fois avec TCA 5% puis un ultime lavage est réalisé avec 3 ml d'alcool absolu.
- les filtres sont ensuite séchés et la radioactivité comptée.

TABLEAU VIII : tableau comparatif des concentrations des réactifs.

| VIRUS<br>REACTIFS   | HIV                             | Mu MLV                           | VISNA              | AMV                              |
|---|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| Tampon<br>Tris HCl  | 50 mM<br>PH = 8                 | 50 mM<br>PH = 8,3                | 100 mM<br>PH = 8,3 | 50 mM<br>PH = 8,3                |
| Agent réducteur<br>DTT<br>GSH                             | 5 mM<br>0,3 mM                  | 20 mM<br>-                       | 2 mM<br>-          | 1 mM<br>-                        |
| Cation monovalent<br>KCl                                  | 150 mM                          | 60 mM                            | 100 mM             | 40 mM                            |
| Cation bivalent<br>MgCl <sub>2</sub><br>MnCl <sub>2</sub> | 5 mM<br>-                       | -<br>0,6 mM                      | 50 mM<br>-         | 6 mM<br>-                        |
| Détergent<br>Triton X100<br>Nonidet P40                   | 0,05 %<br>-                     | -<br>0,05 %                      | 0,1 %<br>-         | -<br>0,2 %                       |
| Modèle<br>Amorce<br>poly(rA) oligo(dT)                    | 50 µg/ml                        | 10 µg/ml                         | 10 DO/ml           | 10 µg/ml                         |
| Substrat<br>marqué  | 7,5 µM<br>[ <sup>3</sup> H]dTTP | 10 µM<br>α[ <sup>32</sup> P]dTTP |                    | 1,01 µM<br>[ <sup>3</sup> H]dTTP |

**Tableau IX :** Comparaison du temps nécessaire pour effectuer une série de tests de la TI du HIV entre une méthode standard et une microméthode. [40]

| Etapes du dosage  | macrométhode | microméthode       |
|---|--------------|--------------------|
| temps requis par la préparation du surnageant et pour l'obtention des pools viraux qui seront congelés à - 70°C | 4 heures     | 4 heures           |
| solubilisation du virus conservé à - 70°C   | 15 minutes   | 2 minutes          |
| transfert des échantillons solubilisés dans les tubes et les plaques  | 30'          | 30'                |
| incubation avec le mélange réactionnel  | 2 heures     | 2 heures           |
| arrêt de la réaction  | 8 minutes    | 8 minutes          |
| séchage des filtres addition de liquide scintilla-<br>teur, comptage  | 30 minutes   | 30 minutes         |
| gain de temps par série de test   | -            | environ<br>1 heure |

légende : les temps moyens sont calculés pour un dosage quotidien de 45 échantillons effectués en triple.

Tableau X : Comparaison de la quantité nécessaire (en ml) par micro et macrométhode pour évaluer l'activité de 45 échantillons en triple. [40]

| réactifs              | macrométhode | microméthode |
|-----------------------|--------------|--------------|
| TCA 10 %              | 405          | 13,5         |
| TCA 5 %               | 2 400        | 650          |
| liquide scintillateur | 1 080        | 270          |
| Ethanol               | 650          | 50           |

#### d) Intérêts et objectifs de ce protocole :

Ces techniques peuvent être automatisées et permettent de tester rapidement de grandes séries de molécules. La méthode standard adaptée en microméthode sert à évaluer des milliers d'échantillons par mois [35] assurant ainsi une recherche empirique d'inhibiteurs actifs : *in vitro* sur la transcriptase inverse. Ce procédé permet également d'évaluer la production virale et de visualiser l'effet direct et spécifique d'une molécule sur l'enzyme.

Dans ce chapitre, nous détaillerons et illustrerons les différents objectifs de ce protocole.

#### d-1) - Sélection de l'activité inhibée :

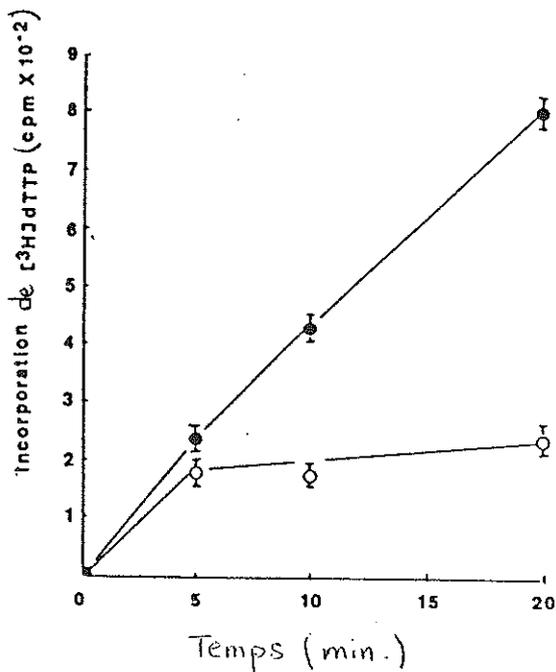
Suivant le choix du modèle amorce, ce type d'essai permet de tester sélectivement l'effet d'un inhibiteur sur l'activité polymérasique et / ou ribonucléasique de la T.I.. L'activité inhibitrice d'une substance est ainsi mieux cernée et mieux définie.

Cet objectif est illustré par les courbes définissant les effets du captan et du phosphonoformate sur les activités ADN polymérasiques et ribonucléasiques de la transcriptase inverse de l'AMV. [43,44]

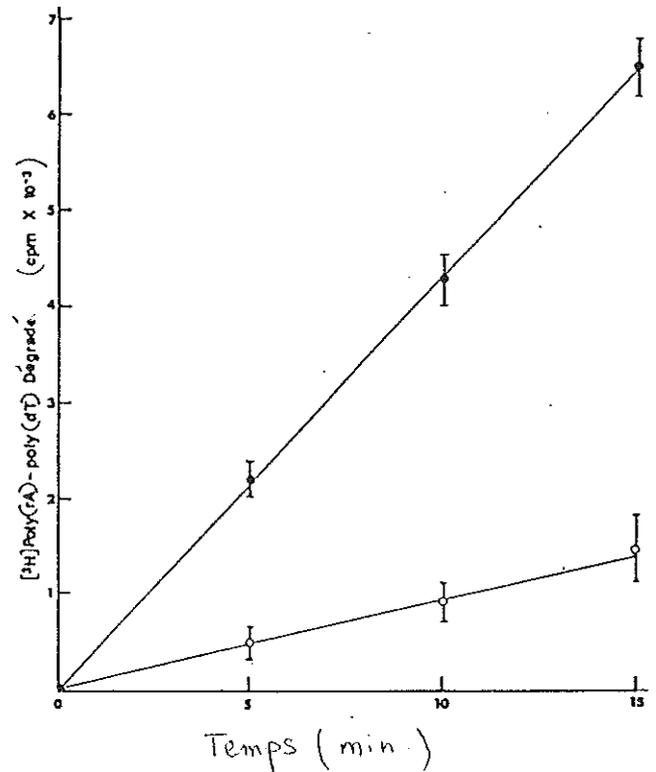
L'action du Captan implique deux mécanismes d'inhibition distincts puisque son activité antiribonucléasique est immédiate alors que son effet sur la polymérase est retardé (courbes I et II).

La courbe III montre que le phosphonoformate est un inhibiteur sélectif de l'activité polymérasique.

Courbes I et II : Effet du Captan sur l'activité polymérasique et RNasique de la T.I. de l'AMV en fonction du temps. [43]



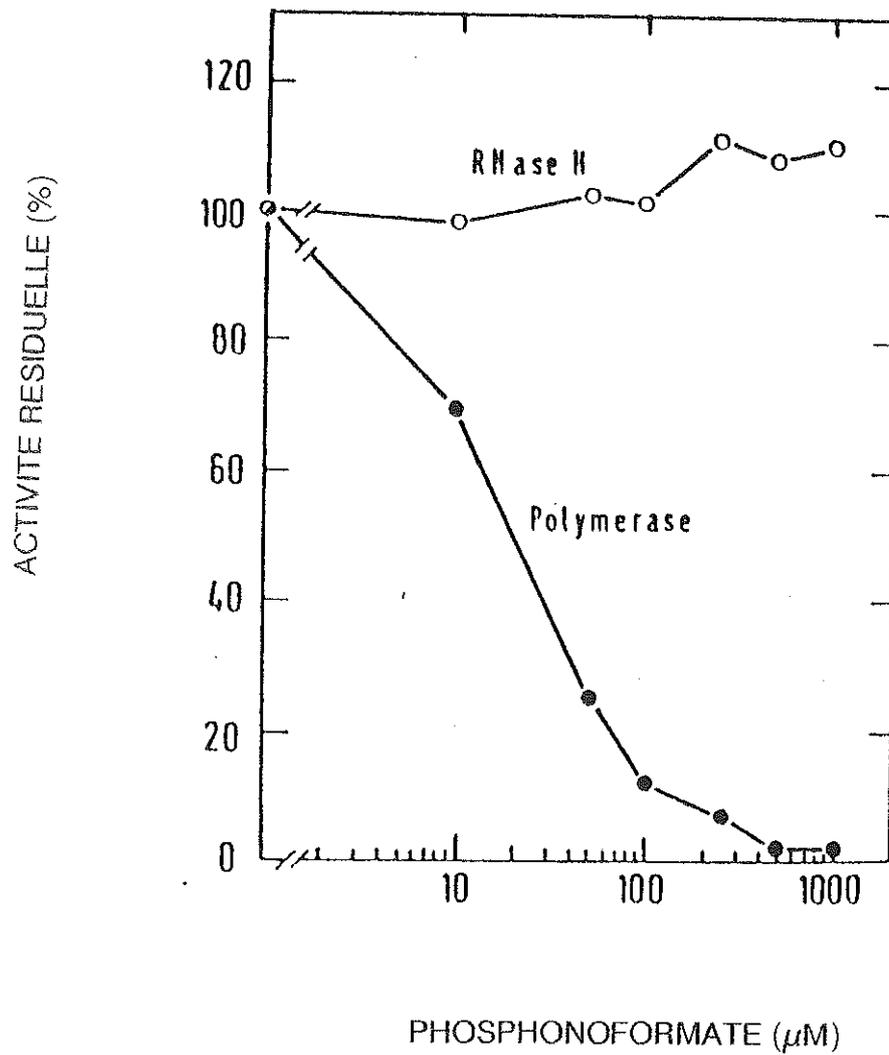
Courbe I : Effet du captan sur l'activité polymérasique avec comme modèle amorce le poly(rA)-oligo(dT)



Courbe II : Effet du captan sur l'activité ribonucléasique de l'AMV-TI avec comme modèle amorce le [3H]poly(rA)-poly(dT)

Légende : Les activités sont testées en présence (○) ou en absence (●) de 1mM de Captan. Chaque point représente la valeur moyenne de 3 essais et les variations dans chaque dosage sont représentées par les barres verticales.

Courbe III : Effet du phosphonoformate sur les activités polymérisiques et ribonucléasique de l'AMV-TI en fonction de la concentration en inhibiteur. [44]



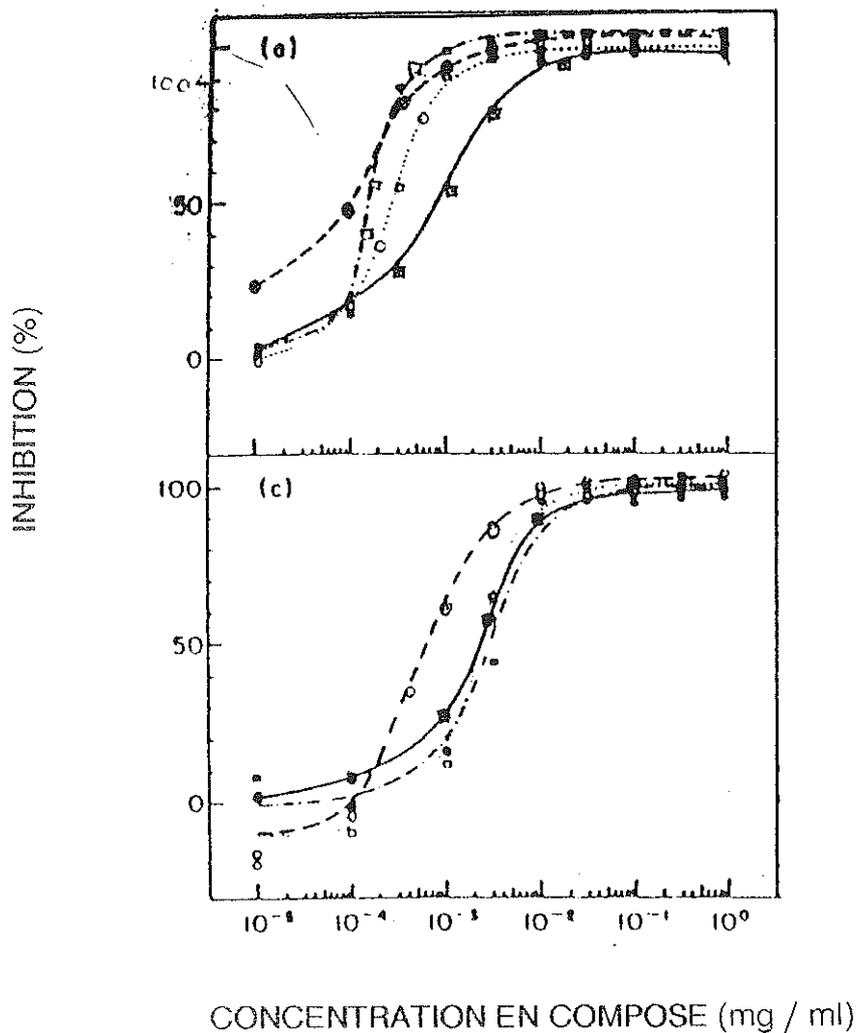
#### d-2) Sélectivité de l'inhibiteur :

Ce type d'étude consiste à tester l'activité comparative d'un inhibiteur sur les polymérase virales et cellulaires [45]. L'illustration choisie est ici l'étude de l'activité inhibitrice de deux substances utilisées en chimiothérapie antirétrovirale : l'HPA-23 et la suramine.

Les résultats (Courbe IV) montrent que quel que soit le composé testé l'activité inhibitrice sur les polymérase cellulaires et virales est dose-dépendante. De plus, il est à remarquer que l'on ne peut pas obtenir *in vitro* une inhibition complète de l'activité de l'enzyme virale sans inhiber totalement les enzymes cellulaires.

L'importance de ces dosages est de pouvoir déceler *in vitro* des composés qui n'altèreraient pas les polymérase cellulaires : ils reflètent donc la toxicité cellulaire des inhibiteurs. Malheureusement les résultats obtenus à ce jour pour toutes les molécules testées sont semblables à ceux décrits.

Courbe IV : Influence des inhibiteurs HPA-23 et suramine sur la HIV-TI et sur l'activité des polymérase cellulaires  $\alpha, \beta, \gamma$  [45]



Légende : La figure (a) étudie l'effet du HPA-23 alors que la figure (c) s'intéresse à l'effet inhibiteur de la suramine.

Les symboles représentent les activités enzymatiques suivantes :

● = HIV-RT / ○ = ADN polymérase  $\alpha$  / ■ = ADN polymérase  $\beta$  / □ = ADN polymérase  $\gamma$ .

### d-3) Quantification de l'activité antirétrovirale :

Le principe est le suivant : il s'agit de déterminer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de composé ajouté [46,47,48]. Lors de toutes les études faites, la dose-dépendance de l'activité inhibitrice a été établie : plus la dose est élevée, plus l'inhibition de l'activité de la transcriptase inverse est importante.

Le but est de sélectionner les molécules pour lesquelles on observe une inhibition importante à une faible concentration par rapport à celles qui nécessitent des concentrations plus importantes.

### d-4) Cinétique de l'inhibition :

La base de cette technique repose sur une méthode graphique qui linéarise les résultats (Lineweaver Burk où  $V$  représente la vitesse de la réaction enzymatique et  $S$  la concentration en substrat.  $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{S}\right)$  )

Elle permet de définir le type d'inhibition provoquée par un composé. Les courbes V et VI illustrent les types de graphiques observés dans les deux cas les plus fréquents : inhibition compétitive et non compétitive.

Toute l'étude est fondée sur la variabilité d'une constante graphique  $K_m$ , constante de Michaelis, qui est égale à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale. (cf. courbe V) L'inverse de  $K_m$  représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

L'addition d'un inhibiteur compétitif augmente la constante de Michaelis. Dans ce cas, la droite de l'inhibiteur coupe la droite sans inhibiteur sur l'axe des ordonnées (cf. courbe VI). L'affinité du substrat pour l'enzyme diminue.

Les inhibiteurs non compétitifs ne modifient pas  $K_m$ . Le point d'intersection des droites se situe sur l'axe des abscisses. L'invariabilité de  $K_m$  signifie qu'il n'y a pas de compétition entre le composé testé et le substrat au niveau du site actif de l'enzyme (cf. courbe VI).

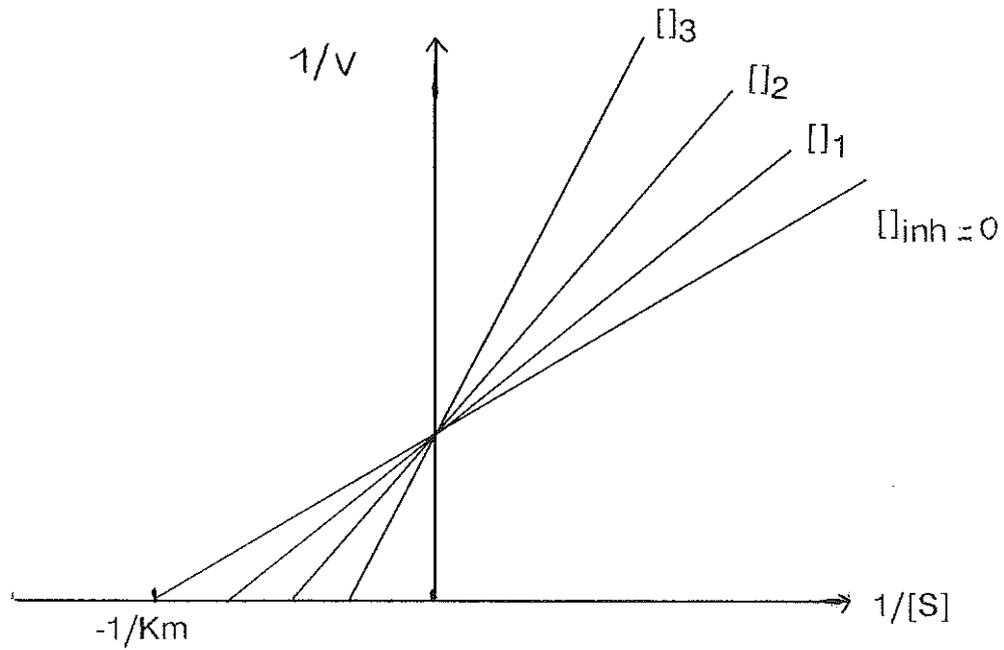
Les courbes VII, VIII, IX étudient l'inhibition vis à vis du substrat naturel de la transcriptase inverse, le dTTP. Elles montrent que l'isomère erythro-AZT

triphosphotylé et les didésoxynucléosides, ddTTP et N<sub>3</sub>dTTP, agissent par inhibition vis à vis respectivement de la TI de l'AMV et du FIV (Féline Immunodéficiency Virus). Le PFA et l'isomère threo sont des inhibiteurs des transcriptases inverses aviaire et féline qui n'entrent pas en compétition avec le substrat de l'enzyme.

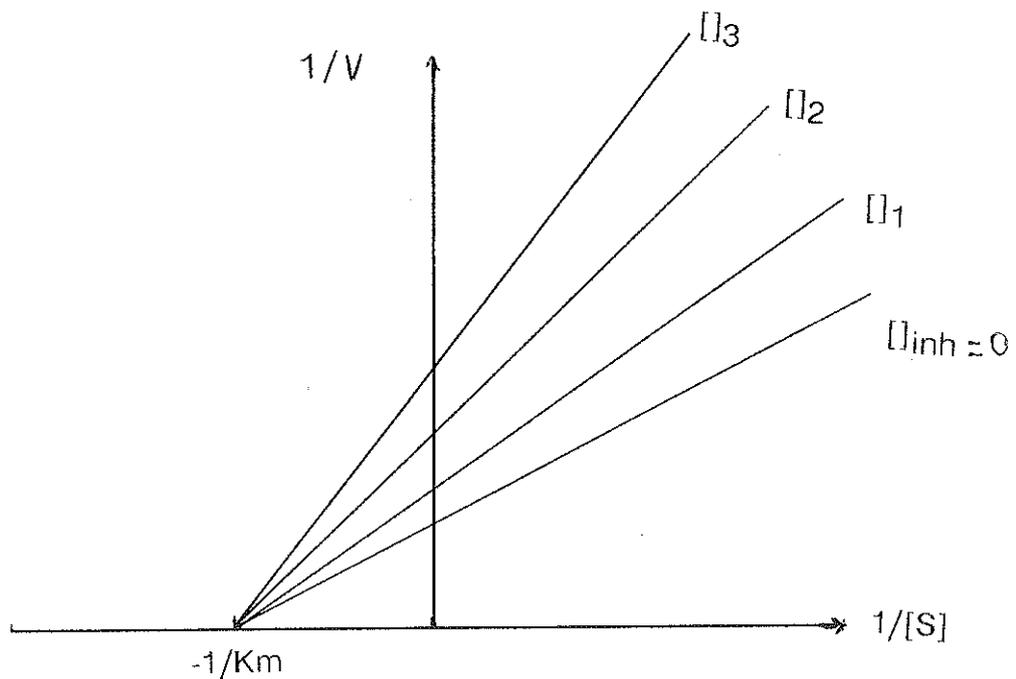
De la même manière, il est possible d'étudier l'effet de la molécule sur le modèle amorce (poly(rA) oligo(dT)). Dans ce cas, l'axe des abscisses représente l'inverse de la concentration en modèle-amorce. L'exemple choisi (courbe X) illustre l'inhibition compétitive de la suramine sur la transcriptase inverse de l'AMV. Cette observation suggère que la suramine agit au niveau du site de liaison du modèle-amorce de l'enzyme.

Ces essais assurent ainsi une meilleure connaissance du site d'action des inhibiteurs anti transcriptase inverse.

Courbe V : Inhibition compétitive.

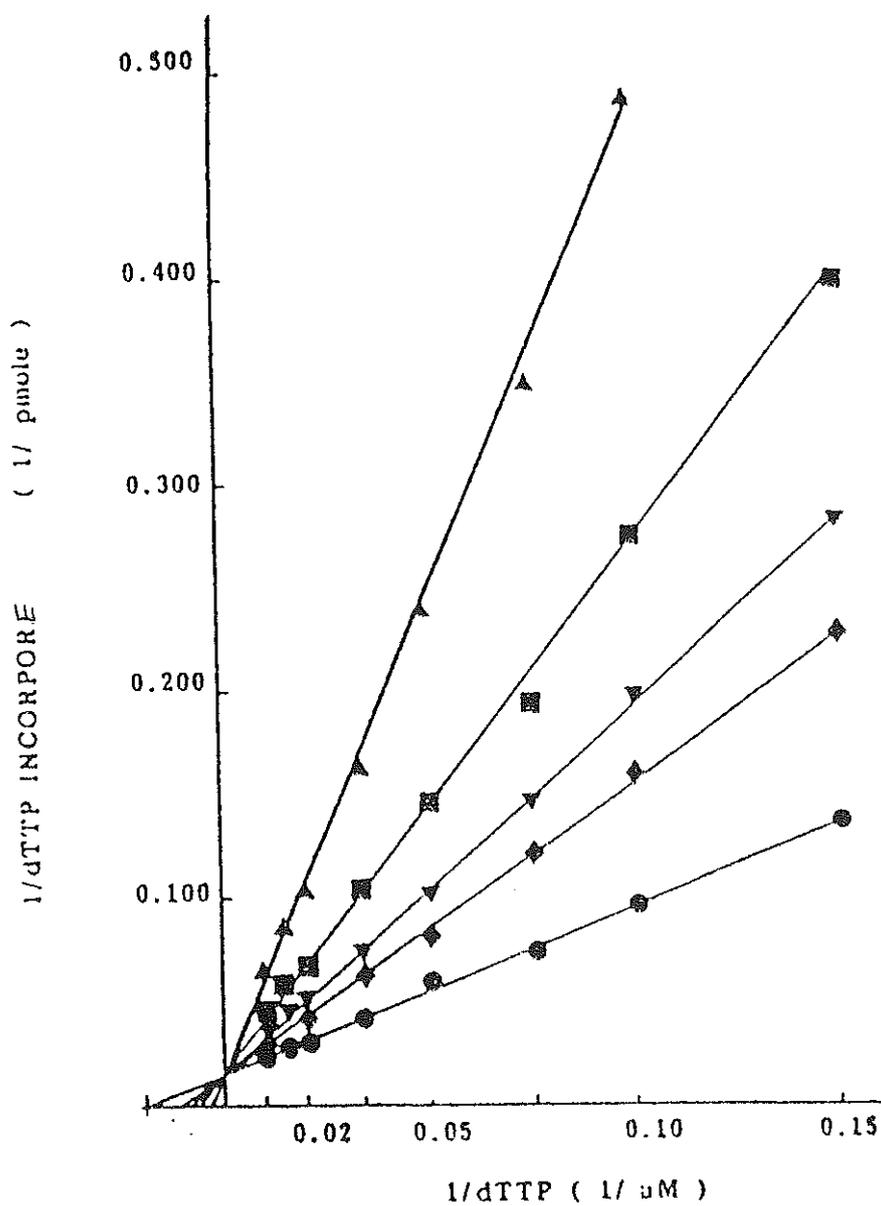


Courbe VI : Inhibition non compétitive.



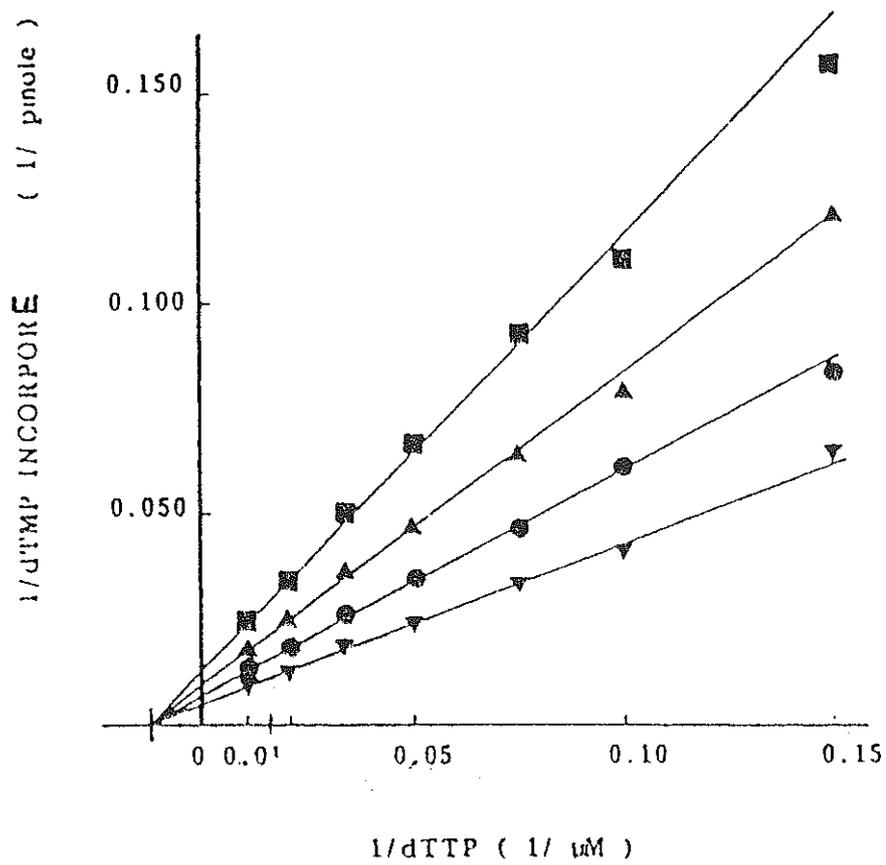
Légende : . La droite  $[I]_{inh} = 0$  correspond à la droite de référence : pour laquelle la concentration est nulle. Les trois droites  $[I]_1$ ,  $[I]_2$  et  $[I]_3$  représentent respectivement l'activité transcriptase inverse observée après addition de concentrations croissantes d'inhibiteur à savoir  $[I]_1 < [I]_2 < [I]_3$ . La constante graphique  $-1/K_m$  représente l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Courbe VII : Inhibition compétitive de l'AMV-TI par l'isomère érythro de l'AZT triphosphorylé. [49]



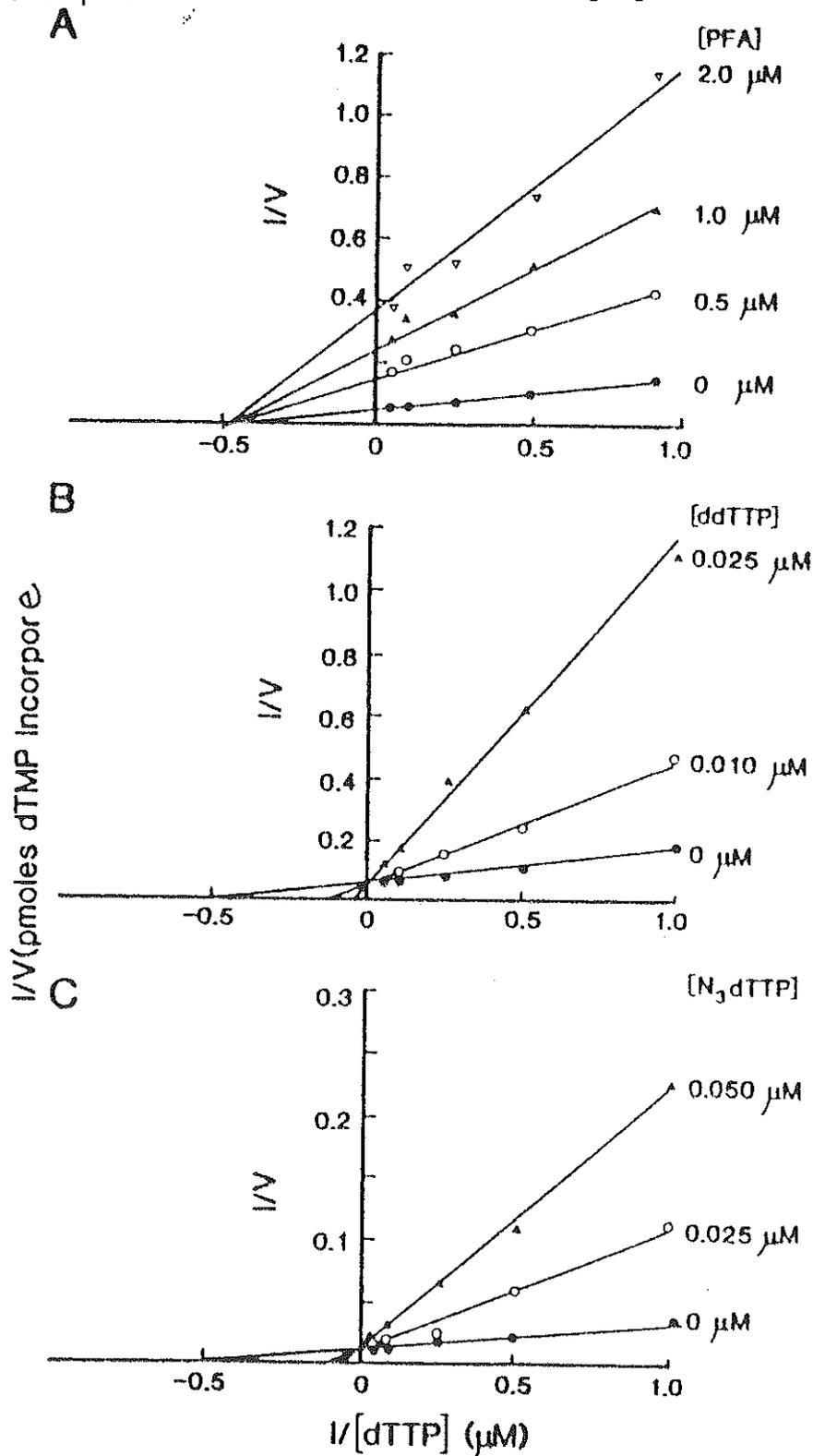
Légende : L'intervalle de concentration en substrat naturel dTTP est compris entre 6,7 et 100  $\mu\text{M}$ . Les concentrations en érythro-AZT-triphosphorylé sont de : 0 ( $\bullet$ ) ; 0,3 ( $\blacklozenge$ ) ; 0,5 ( $\blacktriangledown$ ) ; 1,0 ( $\blacksquare$ ) ; 2,0 ( $\blacktriangle$ )

Courbe VIII : Inhibition non compétitive de l'AMV-TI par l'isomère thréo de l'AZT triphosphorylé. [49]



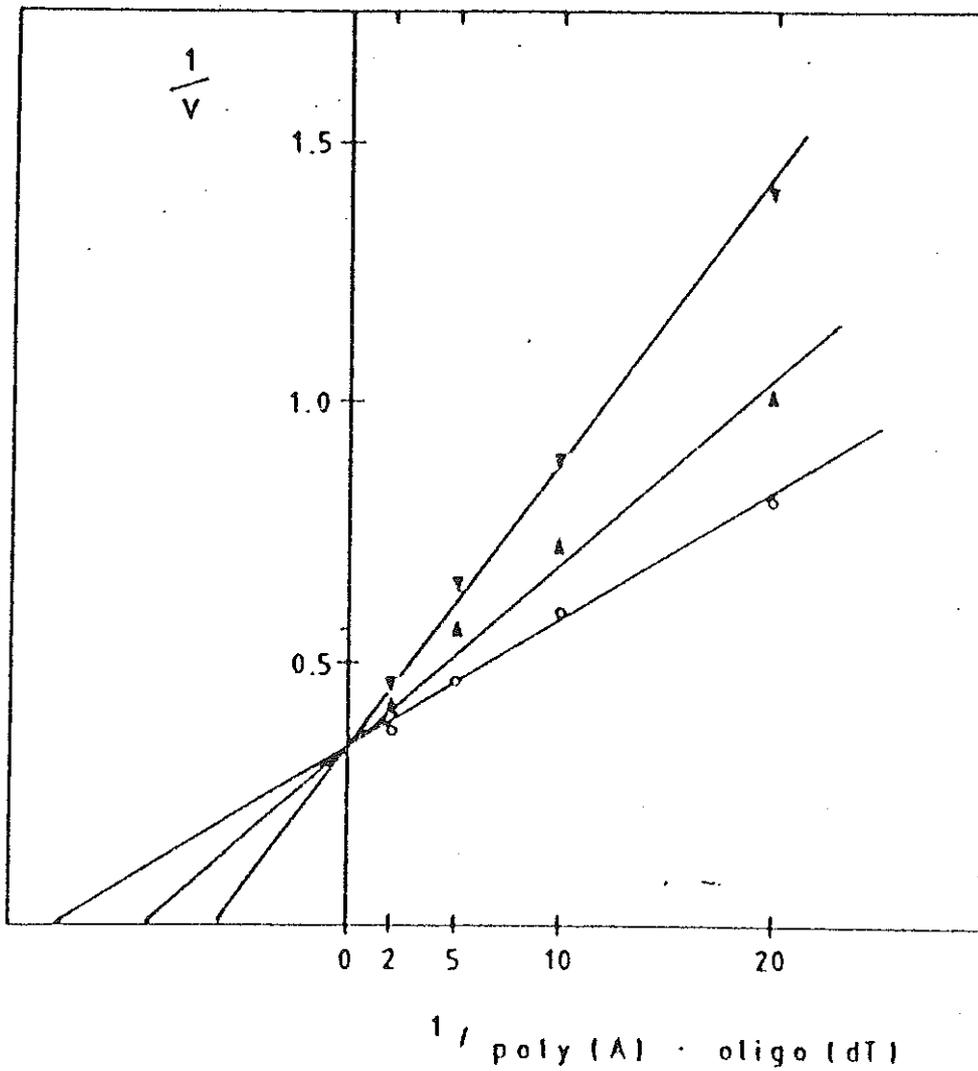
Légende : L'intervalle de concentration en dTTP est compris entre 6,7 et 100mM. Les concentrations en inhibiteurs sont de 0 (▽) ; 2,0 (◉) ; 5,0 (▲) ; 10 (◻)

Courbe IX : Effet du PFA et des didesoxynucléosides ddTTP, N<sub>3</sub>dTTP sur la transcriptase inverse du lentivirus félin : FIV. [50]



Légende : cas A : Inhibition non compétitive du PFA  
 cas B : inhibition compétitive du ddTTP  
 cas C : inhibition compétitive du N<sub>3</sub>dTTP

Courbe X : Cinétique de l'inhibition de la transcriptase inverse de l'AMV par la suramine. [51]



Légende : Les concentrations en suramine sont de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  ( $\nabla$ ) ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ( $\blacktriangle$ ) ; 0  $\mu\text{g/ml}$  ( $\circ$ )

## 2°) - Méthodes de marquage immunologique :

Ces techniques mettent en évidence la présence d'un antigène viral même en très faible quantité et mesurent la réduction de l'expression des antigènes par les inhibiteurs antirétroviraux. Les réactions Ag-AC peuvent être visualisées par une variété de méthodes et de marqueurs. Les marqueurs les plus utilisés sont les fluorochromes et les enzymes, mais il existe aussi des marqueurs radioactifs et des marqueurs bioluminescents.

### 2-1) L'immunofluorescence indirecte :

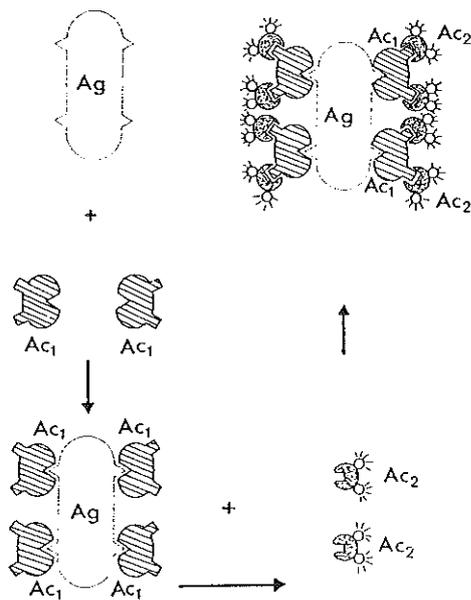
Les antigènes viraux peuvent être mis en évidence au niveau de la cellule à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Pour la méthode indirecte, les anticorps utilisés sont dirigés contre les immunoglobulines d'une espèce animale ayant servi à la production des anticorps viraux (schéma XV).

La méthodologie est la suivante : [52] Des cellules infectées sont récupérées par centrifugation, le culot est mis en suspension dans du tampon phosphaté salin. Elles sont alors séchées sur des lamelles, fixées à l'acétone puis incubées à 37°C dans une solution contenant les anticorps dirigés contre le virus. Après 30 minutes de contact, la lamelle est lavée avec le tampon salin. Une seconde incubation à 37°C est réalisée avec une solution saline renfermant les anticorps anti-espèces marqués à la fluorescéine. Après lavage, la fluorescence émise par les cellules qui présentaient l'antigène viral est observée au microscope à fluorescence.

L'étude de l'inhibition du HIV par le polyxylane sulfaté a montré que le taux d'antigènes détecté diminue avec l'augmentation de la concentration en produit.

[53]

Schéma XV : Principe de l'immunofluorescence indirecte.



Légende : Ag = Antigène

(AC<sub>1</sub>) : les anticorps C<sub>1</sub> sont les anticorps non marqués : les immunoglobulines dirigées contre le virus.

(AC<sub>2</sub>) : Les anticorps C<sub>2</sub> sont ceux marqués à la fluorescéine : ils sont dirigés contre les anticorps C<sub>1</sub>

## 2-2) Essai immunoenzymatique : (EIA)

Le principe consiste à rechercher, dans un surnageant cellulaire clarifié, les antigènes viraux extraits par un détergent (Triton X-100, Nonidet P40). La recherche est réalisée par des anticorps spécifiques du rétrovirus recherché.

Nous développerons dans ce paragraphe la détection de l'Ag p24 du HIV par le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), commercialisé sous la forme de kits prêts à l'emploi : parmi les plus employés, citons les trousse d'Abbott, de Behring, de Diagnostics Pasteur, de Du Pont De Nemours. [54]

### 2-2-1) Principe de la technique ELISA :

Cette technique permet l'utilisation de substrats chromogènes et une visualisation de la présence des complexes immuns par l'apparition de produits colorés. L'Ag viral est décelé par une immunoglobuline conjuguée à une enzyme dont le substrat se colore avec une intensité mesurable en densité optique (DO).

Cette DO quantifie la réaction Ag-Ac, l'antigène étant ici la protéine p24 du HIV.

### 2-2-2) Résultats :

Les résultats obtenus montrent que l'effet inhibiteur d'une molécule sur l'expression des antigènes p24, au sein d'une culture cellulaire, est dose-dépendant. [55] De plus, une corrélation a été établie, entre les résultats observés lors du dosage de l'activité TI et ceux obtenus par détermination du taux d'Ag [56]. Une diminution de l'ATI se traduit par une baisse du taux d'antigène.

## 3°) - Etude des synergies d'inhibition :

### a) Intérêts :

Cette méthode permet d'étudier les interactions entre les effets de plusieurs substances utilisées simultanément contre une infection rétrovirale (activités synergiques ou antagonistes).

Cette technique permet d'envisager une application en vue d'une polychimiothérapie dans le cas du SIDA et des autres pathologies dont les agents sont des rétrovirus : augmentation de l'effet inhibiteur par blocage du cycle viral à plusieurs stades, diminution de la toxicité (l'utilisation combinée de plusieurs médicaments pouvant laisser envisager une diminution de la posologie de chacun), et la possibilité de voir diminuer le risque d'apparition de résistance du virus.

#### b) Description de la méthode : [57]

Cette technique utilise un programme informatique (référence du logiciel [58] : l'isobologramme et le MDEA exposé par R. Schinazi (Multiple Durg Effect Analysis). La méthode est celle de Chou et Talalay. [59]

L'équation de base est la suivante :

$$CI = \frac{X_{comb}}{X_{seul}} + \frac{Y_{comb}}{Y_{seul}} + \frac{\alpha(X_{comb} + Y_{comb})}{X_{seul} \times Y_{seul}}$$

CI est l'indice de combinaison.  $\alpha$  peut prendre deux valeurs : il est égal à 0 quand les deux composés ont un mode d'action semblable et à un lorsque les deux molécules ont des modes d'action indépendants. X seul est la concentration de substance provoquant une inhibition de 90 % de l'activité transcriptase inverse.  $X_{comb}$  est la concentration d'inhibiteur qui, en combinaison avec le composé Y, donne le même pourcentage d'inhibition. Le pourcentage d'inhibition est calculé en fonction de l'activité TI.

Trois cas se présentent :

- CI < 1 : il y a une synergie d'action des deux composés.
- CI = 1 : Les deux substances ont un effet additionnel.
- CI > 1 : Les deux molécules sont antagonistes.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'isobologramme, graphique portant en abscisse la concentration (en  $\mu\text{M}$ ) d'une substance et en ordonnée celle de l'autre composé à tester. Pour chaque molécule, on détermine la concentration pour laquelle est obtenue une inhibition de 90 % de l'ATI par rapport à un témoin de contrôle non traité. Une droite relie ces deux points. Parallèlement, ont été réalisés des échantillons infectés traités simultanément par les deux substances.

Les concentrations de combinaisons des deux drogues donnant le même pourcentage d'inhibition sont placées sur le graphique. Si ces derniers points sont situés sous la droite, les deux composés ont une action synergique, au dessus de la courbe il y a antagonisme, sur la ligne les molécules ont des actions additives.

c) Exemple :

Le tableau XI, ci-joint, étudie l'effet combiné des produits. Des résultats importants ont été mis en évidence : l'AZT et le PFA ont une action synergique vis à vis du VIH-I. Il en est de même pour l'AZT et le sulfate de Dextran, l'AZT et l'Acyclovir.

En effet, les effets synergiques et additifs observés pourraient peut-être, s'il en est de même *in vivo*, permettre de diminuer les posologies d'AZT réduisant ainsi sa toxicité.

Tableau XI : Effets des combinaisons d'agents anti HIV *in vitro*. [61]

| Combinaisons |                    |             |
|--------------|--------------------|-------------|
| Composé 1    | Composé 2          | Effet       |
| PFA          | HuIFN- $\alpha$    | Synergique  |
| AZT          | HuIFN- $\alpha$    | Synergique  |
| AZT          | Sulfate de Dextran | Additif     |
| AZT          | Acyclovir          | Synergique  |
| AZT          | Ribavirine         | Antagoniste |
| ddCyd,ddeCyd | Ribavirine         | Antagoniste |
| ddAdo,ddGuo  | Ribavirine         | Synergique  |
| PFA          | Ribavirine         | Synergique  |

## CONCLUSION

Les tests que nous venons de décrire sont le passage obligatoire pour tout candidat médicament. Cependant des résultats positifs ne sont qu'un premier pas, le parcours est long jusqu'à la phase terminale des essais cliniques. En effet, aucun test *in vitro* ne peut explorer leur toxicité et leurs paramètres pharmacocinétiques. Seules des études *in vivo* sur des modèles animaux [61] en assurent l'évaluation. Citons comme exemple le CD4 soluble [62], cible leurre pour le HIV, très actif *in vitro*, mais dont la demi-vie est beaucoup trop courte et la stabilité dans les compartiments biologiques beaucoup trop faible pour être utilisé tel quel chez l'homme.

Néanmoins, des résultats encourageants seront peut-être enregistrés car de nouvelles molécules, chaque année plus nombreuses, vont passer le cap des essais cliniques. Elles comprennent de nouveaux analogues des nucléosides, le d4T [2',3' - didésoxy - 2', 3' - didéhydrothymidine], le PMEA [9 - (2-phos - phonylméthoxyéthyl) adénine] ainsi que des composés dont la structure dérive des benzodiazépines (le TIBO, R82150, R 82913) [63]. Ainsi chaque nouvelle molécule mise à la disposition des cliniciens élargit l'éventail des médicaments disponibles dans le cadre d'une polychimiothérapie.

Il ne faut cependant pas réduire la découverte d'inhibiteurs antirétroviraux à la seule lutte contre le SIDA. La découverte du HIV n'est peut-être que la partie visible de l'iceberg et ne fait qu'ouvrir l'ère des rétrovirus comme agents de pathologies humaines. La mise à jour des mécanismes réplicatifs, de nouvelles cibles pour la chimiothérapie et de nouveaux inhibiteurs est autant de gagné dans cette perspective.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## INTRODUCTION

Dans cette étude, nous avons cultivé *in vitro* des cellules de plexus choroïde de mouton qui sont permissives au lentivirus ovin, le Visna-Maedi. La culture cellulaire a été infectée par le virus. L'ECP produit est observé au microscope optique directement ou après coloration au May-Grünwald Giemsa.

Nous avons également mis en évidence la présence du virus en dosant l'activité de la transcriptase inverse dans le surnageant de culture.

Parallèlement, la corrélation de l'activité enzymatique avec la concentration virale a été réalisée. Nous avons pu établir une cinétique de l'activité TI en fonction du temps d'infection.

## I - MATÉRIELS ET MÉTHODES :

### 1°) - Culture des cellules :

Les cellules utilisées sont des cultures primaires de plexus choroïde (PC) de mouton obtenues par la technique des explants.

La culture est réalisée dans des boîtes Corning de 75 cm<sup>2</sup>.

Les cellules PC sont cultivées à 37° dans une étuve à CO<sub>2</sub>, de façon à obtenir un tapis cellulaire complet à 80 %. Le milieu d'entretien, est le M.E.M.E. (Milieu Minimal d'Eagle avec des sels de Earle) supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et par des antibiotiques (Streptomycine mg/ml et Pénicilline).

0,2

100 U/ml

### 2°) - Culture du virus :

Le virus utilisé est la souche Visna k796. Les tapis cellulaires sont inoculés par le virus VISNA à la dose de  $4,6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml pendant 30 minutes.

Le milieu est changé 48 heures après infection, puis quotidiennement jusqu'à apparition de l'ECP (le milieu de survie utilisé pour la culture du virus a la même composition que le milieu d'entretien mais ne contient que 2 % de SVF). Les

surnageants sont récupérés toutes les 24 heures et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à épuisement du tapis : 7 jours environ.

Les surnageants viraux ainsi prélevés sont datés afin de pouvoir étudier la cinétique d'activité de la TI en fonction du temps de post- infection.

### **3°) - Mise en évidence de l'ECP par coloration au May-Gruenwald-Giemsa (MGG) :**

48 heures après inoculation, des cellules réfringentes apparaissent. Elles sont observables au microscope optique directement ou après coloration.

Après élimination du surnageant, les cellules sont fixées à l'alcool, mises en contact 2 minutes avec le May-Gruenwald puis 20 minutes avec le Giemsa dilué au 1/20. Le tapis est rincé avec de l'eau. L'ECP se traduit par la présence de cellules géantes multinucléées ou syncytia. Les noyaux apparaissent colorés en violet et le cytoplasme en bleu pâle. Le nombre de noyaux par cellule peut varier, mais il est souvent supérieur à 10. Ceux ci s'organisent en couronne à l'intérieur de la cellule.

### **4°) - Extraction et dosage de la TI :**

Le surnageant viral est clarifié par centrifugation à 4 000 t/mn pendant 5 minutes.

3 ml de surnageant clarifié sont ultra-centrifugés [20 mn, à 150 000g,  $+ 4^{\circ}\text{C}$ , sur Hitachi CS 100] : les surnageants sont jetés, les parois du tube égouttées et essuyées avec un filtre enroulé autour d'une pince brucelle.

Le culot viral est repris avec 500  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction TNE (pH = 7,4) [Tris HCl 0,01 M (SIGMA) ; NaCl 0,1M ; EDTA 0,001M (SERVA) ; Triton X -100;0,1 % (MERCK)] et laissé 2 à 3 heures à + 4°C. La solution est homogénéisée, aliquotée en fractions de 100  $\mu\text{l}$  et congelée à -80°C.

Le dosage est réalisé à partir de 10  $\mu\text{l}$  d'extrait. Pendant toute la durée du dosage, les tubes sont maintenus à + 4°C dans un bain de glace. Dans chaque tube Eppendorff (1,7 ml CMF France) les différents réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant : 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon à doser ; 30  $\mu\text{l}$  d'eau distillée ; 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  6 mM (ALDRICH - CHEMIE) ; 10  $\mu\text{l}$  de dithiothréitol 4 mM (ALDRICH - CHEMIE) ; 10  $\mu\text{l}$  de KCl 1,5 M (MERCK) ; 10  $\mu\text{l}$  de TrisHCl 0,01M (SIGMA) ; 10  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ] TTP (AMERSHAD) ; 10  $\mu\text{l}$  de poly(rA)- oligo(dT)(10 DO/ml).

Après homogénéisation, les tubes sont incubés une heure à + 37° C au bain marie.

La réaction enzymatique est stoppée à + 4° C par addition de 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'arrêt [Acide trichloracétique 5 % (PROLABO), pyrophosphate de sodium 0,1M (ALDRICH-CHEMIE)] qui précipite les molécules polymérisées.

Des aliquots de 100  $\mu\text{l}$  sont alors filtrés sous vide (filtres MILLIPORE type H<sub>A</sub> 0,45  $\mu\text{m}$  de Ø).

Les filtres sont lavés avec 15 ml de solution d'arrêt, puis avec 10 ml d'éthanol absolu. Ils sont fixés sur une plaque de polystyrène recouverte de papier aluminium et séchés à l'étuve à + 37° C pendant 20 minutes.

La radioactivité résiduelle est alors comptée en présence de 4 ml de liquide scintillateur (lecture sur compteur HEWLETT - PACKARD).

Chaque dosage est réalisé en double. Chaque série de dosage comprend un témoin cellule (tube contenant 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon provenant d'une culture cellulaire

non infectée : T<sub>C</sub>), un témoin tritium (10 µl d'eau distillée : T<sub>T</sub>), un témoin virus prétitré (T+).

Tous les résultats d'activité transcriptase inverse sont exprimés en cpm/ml (coup par minute). Ils ont été établis par rapport au témoin tritium dont la valeur est ramenée à 5 millions de cpm/ml.

## **II - RESULTATS :**

### **1°) - ATI des deux pools viraux :**

Ce premier essai a pour but de développer la technique et de choisir un pool viral suffisamment actif parmi ceux mis à notre disposition pour réaliser les témoins viraux.

Chaque dosage a été réalisé en triple. Les résultats du tableau I représentent pour les pools viraux  $V_1$  et  $V_2$  la moyenne des trois valeurs observées.

L'ATI de l'échantillon  $V_2$  de titre  $3,16 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> / ml est dix fois supérieure à celle obtenue pour le pool  $V_1$ .

C'est donc à partir de  $V_2$  que seront réalisés tous les témoins viraux. Le fait de conserver le même pool comme témoin positif nous permettra de comparer et de mesurer la reproductibilité des résultats au cours des différents dosages.

Tableau I : Activité Transcriptase Inverse des deux pools viraux V<sub>1</sub> et V<sub>2</sub>.

| Echantillon               | Activité (cpm/ml) |
|---------------------------|-------------------|
| Témoin cellule            | 160               |
| Pool viral V <sub>1</sub> | 5 274             |
| Pool viral V <sub>2</sub> | 64 599            |

## 2°) - Cinétiques :

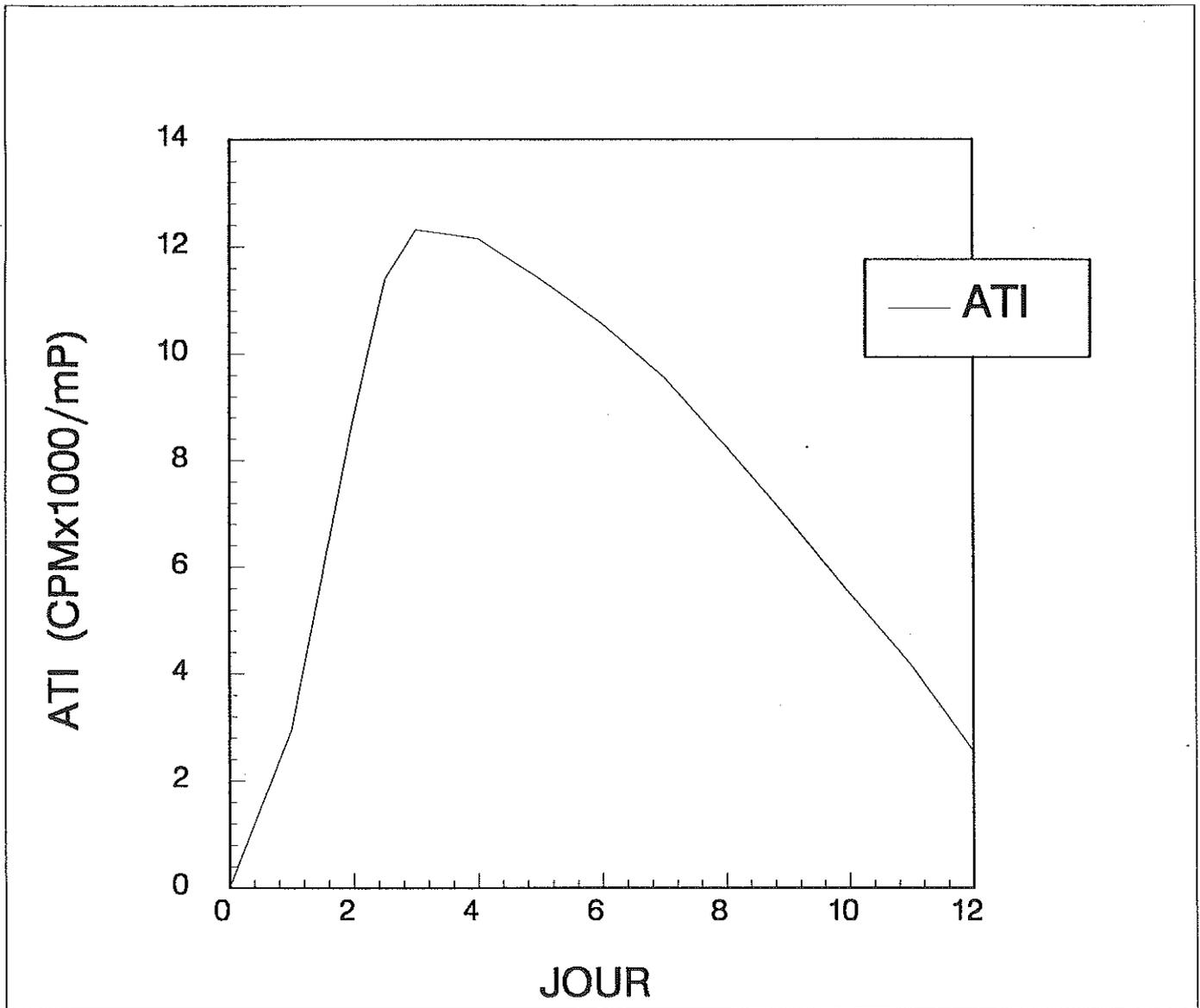
Deux cinétiques d'activité ont été réalisées à un mois d'intervalle.

Pour chaque échantillon les dosages ont été effectués en triple (sauf pour les témoins, T<sub>C</sub>, T<sub>+</sub>, T<sub>T</sub> : 1 seul essai). Les données des tableaux II et III correspondent à la moyenne de ces trois valeurs. J<sub>1</sub> représente le jour d'apparition de l'ECP (environ 48 heures après l'inoculation). L'indice des autres échantillons correspond au jour du prélèvement du surnageant.

Lors de la 1ère cinétique (tableau II), les dosages de l'ATI n'ont pas été effectués tous les jours car il s'agissait d'un essai destiné à tester la technique. Il devait aussi nous permettre de connaître la période à laquelle apparaissait l'ATI. Un pic d'activité a été obtenu à J<sub>3</sub>. La courbe I montre une activité enzymatique croissante de J<sub>1</sub> à J<sub>3</sub> ; Elle décroît ensuite progressivement jusqu'à J<sub>13</sub>. Entre J<sub>1</sub> et J<sub>3</sub>, la valeur de l'ATI est multipliée par 4 (tableau II : pourcentage d'ATI par rapport à l'ATI du pic), elle passe de 23,98 % à 100 %. La décroissance est plus étalée dans le temps.

Tableau II : RESULTATS DE LA PREMIERE CINETIQUE

| Echantillon       | Activité<br>cpm/ml | % d'activité<br>par rapport<br>au témoin<br>viral | % d'ATI par<br>rapport à la<br>valeur maximale<br>enregistrée |
|-------------------|--------------------|---|---|
| J <sub>1</sub>    | 2 954              | 2,36  | 23,98   |
| J <sub>3</sub>    | 12 319             | 9,85  | 100   |
| J <sub>7</sub>    | 9 546              | 7,63  | 77,5  |
| J <sub>12</sub>   | 2 553              | 2,04  | 20,72   |
| Témoin<br>viral   | 125 100            | 100   | -   |
| Témoin<br>cellule | 208                | 0,2   | 1,69  |



*GRAPHIQUE I : ATI en fonction du jour d'infection.*

Pour le second essai (tableau III), en accord avec les résultats précédents, il a été décidé de doser l'ATI entre J<sub>1</sub> et J<sub>6</sub> de façon à encadrer le pic d'activité.

L'activité enzymatique maximale a été obtenue pour l'échantillon J<sub>4</sub>. Entre J<sub>1</sub> et J<sub>4</sub>, nous n'avons pas noté de différences d'activités significatives. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur. Elles sont comprises entre 4463 et 4958 cmp/ml. L'activité décroît à partir de J<sub>5</sub> : on enregistre alors une perte d'activité de 42 % par rapport au pic.

La comparaison des résultats avec l'ATI du témoin viral montre une activité enzymatique très faible puisqu'elle représente 5 % de l'ATI du témoin.

Tableau III : Résultats de la seconde cinétique

| Echantillon     | Activité<br>cpm/ml | % d'activité<br>par rapport<br>au témoin viral | % d'activité<br>par rapport<br>au pic |
|-----------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| J <sub>1</sub>  | 4 647              | 5,31   | 93,6                                  |
| J <sub>2</sub>  | 4 463              | 5,1  | 90                                    |
| J <sub>3</sub>  | 4 769              | 5,44   | 95,99                                 |
| J <sub>4</sub>  | 4 958              | 5,7  | 100                                   |
| J <sub>5</sub>  | 2 894              | 3,31   | 58,37                                 |
| J <sub>6</sub>  | 3 068              | 3,51   | 61,88                                 |
| T <sub>C</sub>  | 1 996              | 2,28   | 40,26                                 |
| Témoin<br>viral | 87 447             | 100  | -                                     |

La multiplication des dosages (choix du pool viral, cinétiques, dilutions) nous a permis d'obtenir un éventail de valeurs pour les témoins cellules et les témoins viraux suffisamment grand pour étudier la reproductibilité des résultats. Les tableaux IV et V récapitulent les valeurs observées.

L'intervalle d'activité pour le témoin viral est compris entre 64 599 et 125 100 cpm/ml (tableau IV). A l'exception de l'échantillon N° 2, les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur. La valeur moyenne calculée à partir des 4 résultats est de 87 553 cpm/ml.

Pour le témoin cellule, 4 échantillons sur 7 ont une activité inférieure ou égale à 200 cpm/ml. Les autres résultats enregistrés sont compris entre 1 500 et 2 000 cpm/ml. La moyenne d'ATI pour le témoin cellule, 891 cpm/ml, est une indication du seuil de négativité de la technique.

Tableau IV : valeurs obtenues pour le témoin virus V<sub>2</sub> lors des différents dosages de l'activité de la transcriptase inverse.

| Echantillons | ATI cpm/ml |
|--------------|------------|
| 1            | 64 599     |
| 2            | 125 100    |
| 3            | 87 447     |
| 4            | 73 066     |

Tableau V : valeurs obtenues pour le témoin cellule au cours des dosage de l'ATI.

| Echantillons | ATI cpm/ml |
|--------------|------------|
| 1            | 160        |
| 2            | 2 063      |
| 3            | 208        |
| 4            | 1 996      |
| 5            | 190        |
| 6            | 138        |
| 7            | 1 483      |

### 3°) - Dilutions :

Des dilutions croissantes de  $V_2$  ont permis de rechercher si l'ATI était proportionnelle au facteur de dilution.

Les essais ont été réalisés à partir du pool viral  $V_2$ .

Le tableau VI présente l'ATI moyenne (essais réalisés en double) pour chaque dilution virale et le pourcentage d'ATI par rapport au témoin non dilué.

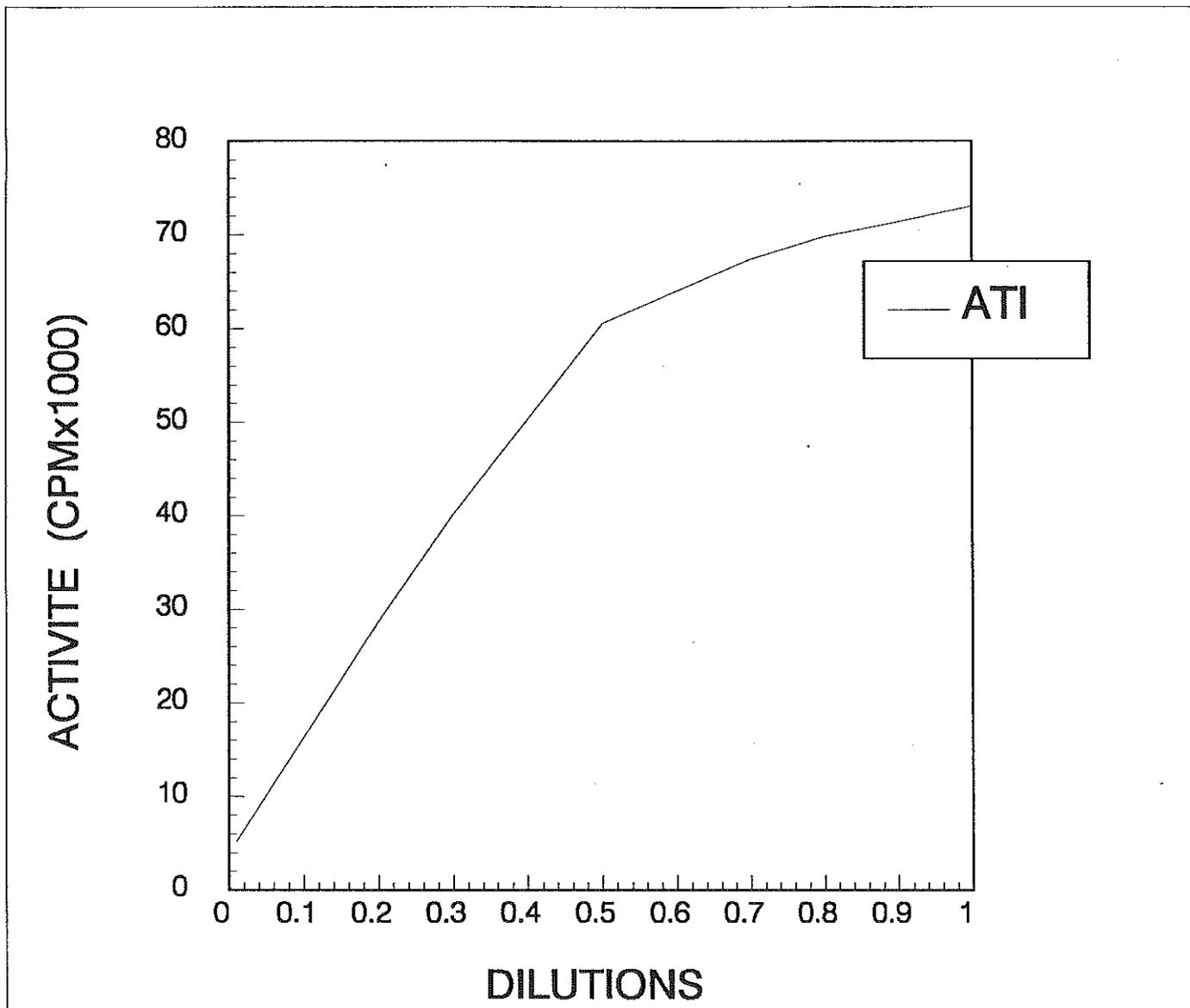
Les graphiques II et III représentent respectivement l'activité observée et le pourcentage d'ATI par rapport au témoin  $V_2$  en fonction du degré de dilution.

Les résultats témoignent d'une diminution de l'ATI en fonction de la dilution virale. Il y a corrélation entre la quantité de virus et la production d'enzyme.

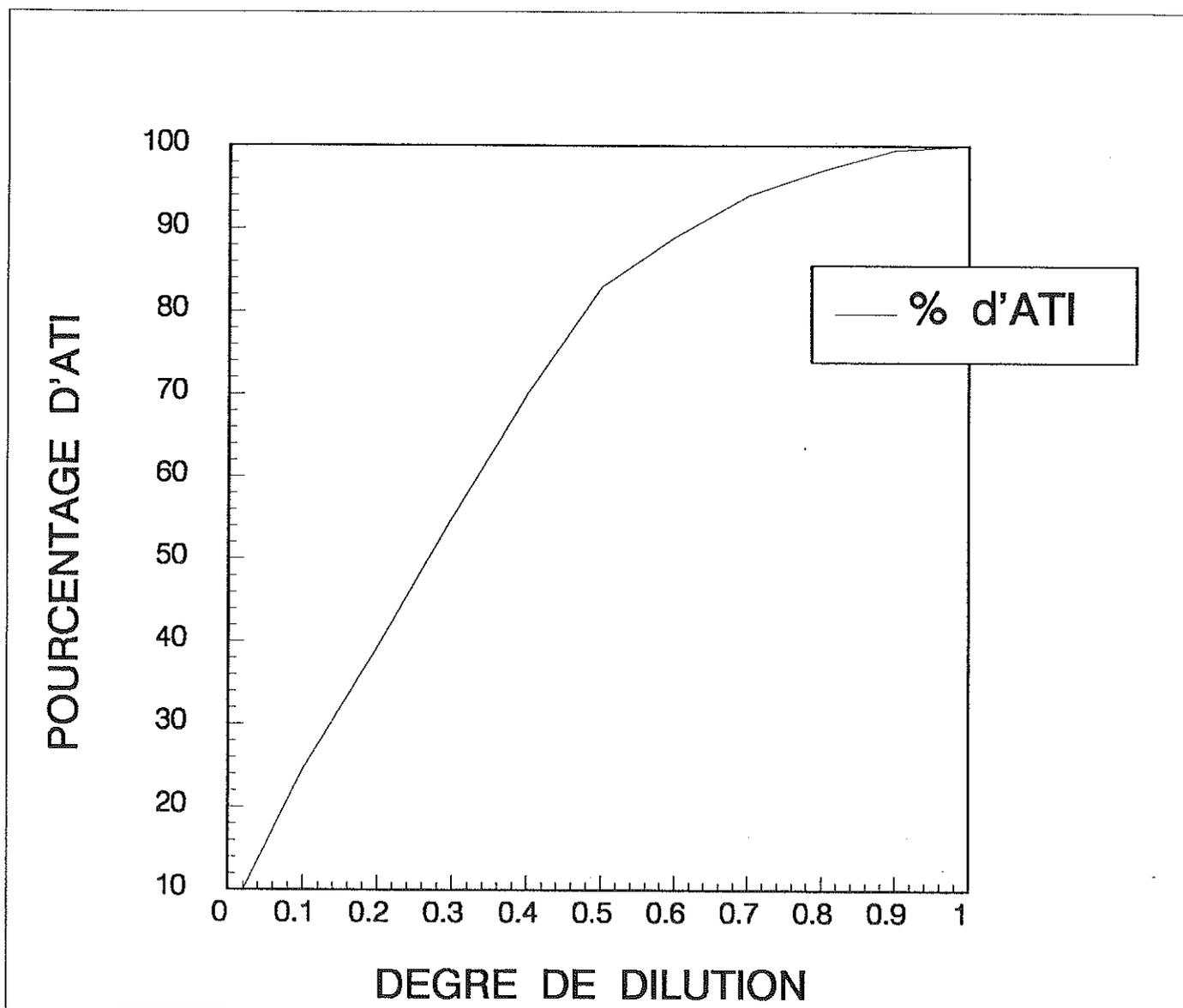
Les deux graphiques montrent que cette relation est linéaire entre les points  $1/100$  et  $1/2$ . Dans cet intervalle de dilution, la pente de la droite est importante : entre deux dilutions successives, l'activité enzymatique décroît rapidement. La perte d'activité entre ces deux dilutions extrêmes est de 76 %. Par contre, sur le segment compris entre la dilution 1 et  $1/2$ , le degré de dilution virale influe peu sur l'activité : la différence d'ATI entre les points  $1/2$  et 1 n'est que de 13 500 cpm/ml ce qui correspond à une perte d'ATI de 17 %.

Tableau VI : Quantification de l'ATI après dilutions virales.

| Degré de dilution                | ATI cpm/ml | ATI/ATI maxi. % |
|----------------------------------|------------|-----------------|
| Témoin viral<br>non dilué :<br>1 | 73 066     | 100             |
| 1/2                              | 60 594     | 82,93           |
| 2/5                              | 51 002     | 69,8            |
| 3/10                             | 40 165     | 54,97           |
| 1/4                              | 41 020     | 56,14           |
| 1/5                              | 28 718     | 39,3            |
| 1/6                              | 18 529     | 25,36           |
| 1/7                              | 22 396     | 30,65           |
| 1/8                              | 18 304     | 25,05           |
| 1/10                             | 17 949     | 24,57           |
| 1/50                             | 7 390      | 10,11           |
| 1/100                            | 5 222      | 7,15            |
| Témoin cellule                   | 190        | 0,26            |



*GRAPHIQUE II : Représentation de l'ATI en fonction du degré d'infection.*



*GRAPHIQUE III : Pourcentage d'ATI en fonction du degré de dilution.*

### **III - DISCUSSION :**

L'étude des témoins cellules et viraux permet d'évaluer la fiabilité de la méthode et la reproductibilité des résultats. Mais existe-t-il une différence d'activité significative entre ces deux témoins ? Les valeurs obtenues sont-elles du même ordre de grandeur d'une série de dosage à l'autre ?

Le témoins virus détermine l'ATI d'un pool viral de référence que l'on sait actif. Les résultats (tableau IV) reflètent tous une activité enzymatique significative mais avec un écart qui peut aller du simple au double, ce qui témoigne de la grande sensibilité de la méthode. Le témoin cellule correspond au témoin négatif. Il ne contient pas de virus donc la réaction enzymatique doit être nulle. Théoriquement aucune molécule polymérisée marquée ne peut être synthétisée, par conséquent aucune radioactivité ne doit être décelée au niveau du filtre. Les valeurs obtenues sont très inférieures à celles observées pour le témoin viral. Elles demeurent comprises entre 150 et 2 000 cpm/ml, ce qui témoigne d'un léger bruit de fond. Par comparaison, l'ATI du témoin viral est en moyenne de 85 000 cpm/ml.

Les résultats expérimentaux sont donc en accord avec la théorie. Nous avons avec ces deux témoins, repères d'activité, obtenus les résultats escomptés.

Nous avons enregistré une certaine homogénéité dans les résultats. Sur les quatre valeurs calculées pour le témoin viral, trois sont du même ordre de grandeur : Seule la valeur de 125 100 cpm/ml est très supérieure aux trois précédentes. C'est pourquoi, pour évaluer la reproductibilité de la méthode, nous avons réalisé les dosages de chaque échantillon en double (dosage de l'ATI dans les dilutions) ou en triple (cinétiques, choix d'un pool viral). Les résultats reportés précédemment correspondent à des moyennes. Nous avons noté une amélioration de la

reproductibilité au fur et à mesure de nos manipulations. Pour la seconde cinétique, la variation entre les trois résultats par échantillon est nettement inférieure que lors de la première cinétique. Il en est de même pour les essais réalisés en double pour les dilutions.

L'explication la plus plausible de cette amélioration est une meilleure maîtrise du protocole expérimental au fur et à mesure des dosages.

Néanmoins, l'étude du dosage proprement dit fait intervenir d'autres facteurs de variation. Au cours du déclenchement de la réaction enzymatique, les réactifs sont ajoutés successivement dans les tubes Eppendorff. Cette étape nécessite une utilisation peut-être excessive des micropipettes. Le fait de mettre successivement 10  $\mu$ l de chaque réactif dans les tubes multiplie le nombre de causes d'erreurs. Il serait sans doute souhaitable de préparer une solution de départ contenant tous les réactifs aux concentrations appropriées (eau distillée,  $MgCl_2$ , DTT, KCl, TrisHCl, [ $^3H$ ] TTP, poly (rA)-oligo (dT)). 90  $\mu$ l de ce mélange réactionnel seraient mis dans les tubes contenant les 10  $\mu$ l d'échantillon à tester. Les causes d'erreur dues au micropipetage seraient ainsi limitées.

L'étude des valeurs observées pour les témoins cellules nous permet aussi d'établir un seuil de négativité pour l'ATI. Au vu de la valeur maximale enregistrée, nous pouvons admettre que toute activité inférieure à 2 000 cpm/ml ne témoigne pas d'une activité transcriptase inverse

Les activités enregistrées au cours de la première cinétique reflètent tous une ATI quantifiable puisque supérieure à 2 000 cpm/ml. Au cours de la seconde cinétique, elles ne dépassent pas 4 500 cpm/ml. Dans les deux cas, les résultats enregistrés sont faibles par rapport au témoin virus, voire même proches du témoin cellule dans le second cas. Il est donc nécessaire de rechercher les causes possibles pouvant expliquer la faiblesse de l'ATI.

Cette étude comporte trois étapes essentielles : la production de virus, l'extraction de l'enzyme TI, et la réaction de polymérisation.

Au cours des cultures cellulaires, nous avons toujours observé un effet cytopathogène, témoin de l'infection des cellules PC et de la multiplication virale. Le surnageant récupérée périodiquement contenait donc du virus.

La seconde étape est l'extraction de l'enzyme. Elle assure la scission de la particule virale libérant ainsi la transcriptase inverse. Les causes d'erreurs peuvent provenir soit de l'ultracentrifugation (20 minutes, 150 000g, 4°C) qui concentre le virus sous forme de culots viraux, soit de l'homogénéisation des particules virales dans le tampon TNE, soit de l'extraction proprement dite (2 heures).

Les paramètres de l'ultracentrifugation ne peuvent être en cause. En effet, de nombreuses études du dosage de la TI du VISNA ont été menées en respectant les mêmes critères de vitesse, de durée et de température. (cf. Partie bibliographique V 1-2-2-c-).

Le seul facteur variable est celui de la durée d'extraction. Au cours de la première cinétique, la durée de l'extraction était de 1 h 30. Nous l'avons prolongé (3 heures). De même, nous avons augmenté la durée et l'intensité de l'homogénéisation à l'agitateur mécanique. Cependant les résultats observés lors de la seconde cinétique n'ont pas été quantitativement améliorés.

De plus, si l'on retient comme hypothèse que l'extraction a été quantitativement insuffisante, comment expliquer alors les résultats obtenus pour les dilutions virales ? Les activités sont nettement supérieures à celles observées pour les cinétiques alors que cette étude a été menée dans les mêmes conditions, notamment pour la durée de l'extraction (3 heures).

Le dernier paramètre est la fragilité du matériel rétroviral. Il ne suffit pas de récupérer le virus et d'extraire l'enzyme, encore faut-il que l'intégrité de l'enzyme soit intacte pour qu'elle demeure active.

L'étude bibliographique nous a révélé que la transcriptase inverse, comme toute enzyme, ne peut fonctionner *in vitro* que si l'on respecte des conditions définies de PH et de concentration pour les réactifs composant le mélange réactionnel. De

faibles écarts sont susceptibles d'entraîner des inhibitions d'activité (partie bibliographique : V 1-2-2-c-1). Nous nous sommes donc conformés lors de cette étude aux conditions énoncées dans la partie bibliographique.

Les rétrovirus et notamment le VISNA sont aussi très sensibles à la température. Il est impératif de maintenir une température de + 4°C lors de l'ultracentrifugation, de l'extraction et de l'arrêt de la réaction enzymatique (partie bibliographique : V-1-2-2-c-2). Le fait que ce facteur entre en compte dans plusieurs étapes du dosage multiplie les contraintes techniques pour le manipulateur : il s'agit donc du paramètre le plus difficile à maîtriser.

L'étude de l'ATI d'un virus dilué a démontré qu'il existe une proportionnalité entre la quantité de virus et l'activité enzymatique résultante. Cette relation quantité de virus - activité apparaît plus marquée lorsque le virus est très dilué (dilutions supérieures à 1/2). Ces résultats renforcent le critère de fiabilité du dosage : moins il y a de virus, moins il y a d'enzyme, moins l'activité polymérasique est importante.

Si l'on compare les résultats obtenus, les cinétiques et les dilutions de virus, on constate que le pic d'activité enregistré lors de la première cinétique (125 000 cpm/ml) correspond à celle d'un virus dilué au moins au 1/10. Pour la seconde cinétique, il correspond à un virus dilué au moins au 1/100. Peut-on considérer qu'il reste encore du virus après une telle dilution ? Entre les valeurs 2 000 cpm/ml et 5 000 cpm/ml doit-on considérer qu'il existe encore une activité virale ?

## **CONCLUSION**

En conclusion, la culture cellulaire apparaît donc comme une source simple de matériel rétroviral dès lors que le milieu utilisé satisfait les exigences nutritionnelles des cellules et qu'elles sont permissives au rétrovirus. Cette expérimentation met aussi en relief la fragilité et la grande sensibilité des rétrovirus à la température et montre que le bon déroulement de l'étude d'une activité transcriptase inverse ne réside pas seulement dans la maîtrise des paramètres intrinsèques au dosage comme pouvaient le laisser croire les principes théoriques énoncés dans la partie bibliographique (cf V, 1-2-2-c-1). Avant de tester les effets de substances inhibitrices, il convient de se familiariser avec la technique et d'acquérir une bonne maîtrise des différents paramètres.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1 - Barré-Sinoussi. F., J.C. Chermann. Isolation of a T - lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983 ; 220 : 868-871
- 2 - Descamps J.M.. Epidémiologie. les chiffres en données brutes. *La lettre de l'infectiologie*, 1989 ; IV(16) : 609-610
- 3 - De Clercq Erik : Perspectives for the chemotherapy of AIDS. *Auticancer research*, 1987 ; 7 : 1023-1028.
- 4 - Beaussoleil S., Bosgiraud C., Nicolas J.A. : Animal lentivirus replication and reverse transcriptase inhibitors. *Reviews of infections diseases*, 1989 ; 11(5) : 732-740.
- 5 - Stuart F.J. Le Grice, Fion Grüniger - Leich : Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 RT by metal chelate affinity chromatography. *Eur. J. Biochem*, 1990 ; 187 : 307-314.
- 6 - Larder B, Purifoy D., Powell K, Darby G. AIDS virus RT defined by high level expression in E. Coli . *EMBO Journal*, 1987 ; 6, (10) : 3133-3137.
- 7 - Martin R. Deibel, Thomas J. Mc Quade. Denaturation refolding of purified recombinant HIV-RT yields monomeric enzyme with high enzymatic activity. *AIDS research and human retroviruses*, 1990 ; 6 (3) : 329-339.
- 8 - Howard M. Temin. Retrons in bacteria. *Nature*, 1989 ; 339 : 254-260.
- 9 - D. Lim, W.K. Meas. RT in bacteria, 1989 ; 3 (8) : 1141-1144.
- 10 - Makoto Matsukura, Kazuo Shinozuka, Gerald Zon. Phosphorothiorate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors of replication and cytopathic effects of HIV. *Medical Sciences*, 1987 ; 84 : 7706-7710.
- 11 - Marilyn S. Smith, E. Leigh, Brian and Joseph S. Pagano. Resumption of virus production after HIV infection of T Lymphocytes in the presence of AZT. *Journal of Virology*, 1987 ; 61 (12) : 3769-3773.
- 12 - Erik G. Sandstrom, Jean C. Kaplan, Roy E. Byrington, Martin S. Hirsch. Inhibition of HTLV III in vitro by phosphonoformate. *The Lancet*, 1985 ; 6 : 1480-1482.

- 13 - Seiji Hayashi, Robert L. Fine, Ting-Chao Chou. In vitro inhibition of the infectivity and replication of HIV by combination of antiretroviral 2',3' - dideoxynucleosides and virus - binding inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1990 ; 34 (1) : 82-88.
- 14 - Hiroaki Mitsuya, Samuel Broder. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of HTLV III/LAV by 2',3' - dideoxynucleosides. *Medical Sciences*, 1986 ; 83 : 1911-1915.
- 15 - Sudhir R. Gogu, Barbara S. Beckman, Krishna C. Agrawal. Anti HIV drugs : Comparative toxicities in Murine fetal liver and bone marrow erythroïd progenitors cells. *Life Science*, 1989 ; 45 (4) : 3-7.
- 16 - J.P. Aymard, R. Ferry, C. Janot, F. Schooneman, B. Legras, T. May, F. Streiff. Toxicity of HPA-23 for normal human myeloïd progenitors cells (GM-CFU) *in vitro*. *Biomed. and Pharmacother*, 1989 ; 43 : 451-454.
- 17 - Nara P.L. , Hatch W.C., Dunlop N-M. Simple, rapid, quantitative syncytium forming microassay for the detection of HIV neutralizing antibody. *AIDS Res Hum. Retrov*, 1987 ; 45 : 283-302.
- 18 - Lothar Biesert, Suhartono Hary, Winkler Irwin. Inhibition of HIV and virus replication by polysulphated polyxylylan : HOE/BAY 946, a new antiviral compound. *AIDS Gower Academic Journal*, 1988 ; 5 : 449-457.
- 19 - Suzuki Harumi, Okubo Akira, Yamazaki Sunao, Suzuki Kenjo. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of HIV by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentrus edodes Mycelia* (LEM). *Biochemical and biophysical research communications*, 1989 ; 160 (1) : 367-373.
- 20 - Sodroski J., Goh W.C., Rosen C., Campbell K., Haseltine W.A. Role of the HTLV III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature*, 1986 ; 322 : 470-474.
- 21 - Huraux J.M., Nicolas J.C., Agut H. *Virologie*. Editions Flammarion Médecine France pages 56-57.
- 22 - Henin Y. Techniques de recherche de la reverse transcriptase : applications à la virologie médicale. *Revue française des laboratoires*, 1990 ; 216 : 35-42.

- 23 - Bertazzoni U., Scovassi A.L., Mezzino M., Sarasin A., Franchi E. and Izzo R. Activity gels for analysing DNA processing enzymes. Trends Genet, 1986 ; 2 : 67-72.
- 24 - Lori Franco, Auna I. Enzymatically Active forms of RT of the HIV. AIDS research and human retroviruses, 1988 ; 7 (5) : 393-398.
- 25 - Vasudevachari M.B., Antony A. Inhibition of AMV-RT and virus inactivation by metal complexes of isonicotinic acid hydrazide. Antiviral research, 1982 ; 2 : 291-300.
- 26 - Lin F.H., Genovese M., Thomar H. Multiple activities of DNA polymerase from VISNA virus. Preparative biochemistry, 1973 ; 3 (6) : 525-539.
- 27 - Milbrey Cates Starnes and Yung Chi Cheng. HIV-RT associated RNase H activity. The journal of biological chemistry, 1989 ; 264 (12) : 7073-7077.
- 28 - Laemmli, Favre. J.Mol. Biol, 1973 ; 80 : 575-599.
- 29 - Milbrey Cate Starnes, Wenyi Gao, Robert Y.C. Ting. Enzyme activity Gel analysis of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. The Journal of biological chemistry, 1988 ; 263 (11) : 5132-5134.
- 30 - Hans E. Huber, John M. Mac Coy, Jasbir S. Seehra ; Charles C. Richardson. Human Immunodeficiency virus I Reverse Transcriptase. The Journal of biological chemistry, 1989 ; 264 (8) : 4669-4678.
- 31 - Lightfoote MM, Coligan JE, Folks TM. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptidic of the acquired immune deficiency syndrome retrovirus. J. Virol, 1986 ; 60 : 771-775.
- 32 - Di Marzo - Veronese FD, Copeland TD, De Vico AL. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV III/LAV. Science, 1986 ; 231 : 1289-1291.
- 33 - Fumitaka Oyama, Rie Dikuchi, Robert J. Crouch. Intrinsic properties of RT in reverse transcription associated RNase H is essentially regarded as an endonuclease. The Journal of biological chemistry, 1989 ; 264 (31) : 18808-18816.
- 34 - Vasudevachari M.B. , Mast T.C., Salzman N.P. Supression of HIV-IRT activity by mycoplasma contamination of cell cultures. AIDS Res-Hum-Retrov, 1990 ; 6 : 411-416.

- 35 - Huber H.E., Mac Coy J.M., Seehra J.S., Richardson C.C. HIV I-RT. J.Biol Chem , 1989 ; 264 (8) : 4669-4678.
- 36 - Majumdar C., Abbotts J., Broder S., Wilson S.H.. Studies on the mechanism of HIV-RT. J. Biol chem, 1988 ; 263 : 15 657- 15 665.
- 37 - Rey M.A., Spire B., Dormont D., Barré-Sinoussi F., Montagnier L., Chermann J.C. Caractérisation of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T Lymphotropic retrovirus. Biochem Biophys Res Commun, 1984 ; 121 : 126-133.
- 38 - F.H. Lin, M. Genovese, H. Thormar. Multiple activities of DNA Polymerase from visna virus. Preparative Biochemistry, 1973 ; 3 (6) : 525-539.
- 39 - Spickett G., Beattie R.E., Bountiff L., Dalgleisch A.G., Webster A.D.B. Quantitation of HIV activity in tissue culture supernatants : effect of culture condition on syncytial assays and virus production. J. Virol Methods 1989 ; 24 : 67-76.
- 40 - Spira Thomas J., Bozeman Lorna H., Holman Robert C. Micromethod for assaying RT-HTLV III/LAV. Journal of clinical microbiology, 1987 ; 25 (1) : 97-99.
- 41 - Goff S., Traktman P., Baltimore D. Isolation and properties of moloney murine leukemia virus mutants : use of a rapid assay for release of virion reverse transcriptase. J. Virol, 1981 ; 38 : 239-248.
- 42 - Spedding G., Raty A., Middleton E.jr. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoïdes. Antiviral research, 1989 ; 12 : 99-110.
- 43 - Freeman-Wittig M.J., Vinacour M., Lewis R.A. Differential effects of Captan on DNA polymerase and ribonuclease H activities of AMV-RT. Biochemistry, 1986 ; 25 (10) : 3050-3055.
- 44 - Margalith M., Falk H., Panet A. Differential inhibition of DNA polymerase and RNase H activities of the RT by phosphonoformate. Molecular and cellular biochemistry, 1982 ; 43 : 97-103.
- 45 - Wondrak E.M., Lower J., Kurth R. Inhibition of HIV I-RNA dependent DNA polymerase and cellular DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  by Phosphonoformic acid and others drugs. Journal of antimicrobial chemotherapy, 1988 ; 21: 151-161.

- 46 - De Clercq E. Suramin in the treatment of AIDS : Mechanism of action. Antiviral research, 1987 ; 7 : 1-10.
- 47 - Sandstrom E.G., Kaplan J.C., Byington R.E.. Inhibition of human T. cell lymphotropic virus type III in vitro by Phosphonoformate. The lancet, 1985 ; 6 : 1480-1482.
- 48 - Matthes E., Lehmann Ch., Scholz D., Von Janta- Lipinski M; Inhibition fo HIV-associated RT by sugar modified derivates of thymidine 5' - triphosphate in comparison to cellular DNA polymerases  $\alpha$  and  $\beta$ . Biochemical and biophysical research, 1987 ; 148(1) : 78-85.
- 49 - Eriksson B., Vrang L., Bazin H., Chattopadhyaya J. Different patterns of inhibition of AMV-RT activity by 3' - Azido - Deoxythymidine 5'- triphosphate and its threo isomer. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1987 ; 31 (4) : 600-604.
- 50 - North T.W., Lee T. North G., Pederson Niels C. FIV, a model for RT - targeted chemotherapy for acquired immuno deficiency Syndrome. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 1989 ; 33 (6) : 915-919.
- 51 - Sandstrom E.G., Schooley R.T., Ho D.D. Detection of human HTLV III antibodies by fixed cell immunofluorescence. Transfusion, 1985 ; 25 : 308-312.
- 52 - Biesert L., Suhartono H.; Winkler I, Meichsner C. Inhibition of HIV and virus replication of polysulphated polyxylan : HOE/BAY 946, a new antiviral compound. AIDS, 1988 ; 22 : 449-457.
- 53 - Tamalet J. Actualités biologiques sur les infections à HIV. Feuilletts de biologie, 1989 ; 30 (168) : 37-44
- 54 - Phalgrini Grepta, Raghavan Balachandran, Monto Ho. Cell to Cell transmission of HIV-I in the presence of Azidothymidine and neutralizing antibody. Journal of Virology, 1989 ; 63 (5) : 2361-2365.
- 55 - Schinazi R.F., Cannon D.L., Arnold B.H. Combinations of Isoprinosine and 3' - Azido - 3'- Deoxythymidine in lymphocytes infected with HIV - I. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1988 ; 32 (12) : 1784-1787.

56 - Smith M.S., Leigh Brian E., De Clercq E. Susceptibility of HIV - 1 replication *in vitro* to acyclic adenosine analogs and synergy of the analogs with 3' - Azido - 3'-deoxythymidine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1984 ; 33 (9) ; 1482-1486.

57 - Chou J., Chou T.C. Dose effect analysis with microcomputer quantification of ED 50, LD 50, synergism and antagonism, low-dose risk, receptor-ligand binding, and enzym kinetics. A computer soft ware for Apple II series or IBM-PC and manual. Elsevier-Biosoft. Elsevier Science Publishers BV - Amsterdam.

58 - Chou T-C, Talalay P. Quantitative analyses of dose effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, 1984 ; 22 : 27-55.

59 - De Clercq E. Perspectives for the chemotherapy of AIDS. *Auticancer research*, 1987 ; 7 : 1023-1028.

60 - Lemaître M., Zerial A. Recherche de médicaments anti SIDA et évaluation de leur efficacité dans des modèles animaux. *Science et techniques de l'animal de laboratoire*, 1990 ; 15 : 115-122.

61 - Smith DH, Byrn RA, Marsters SA. Blocking of HIV - 1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD 4 antigen. *Science*, 1987 ; 238 : 1704-1710.

62 - Pauwels R., Andries K., Desmyter J. Potent and selective inhibition of HIV - 1 replication *in vitro* by a novel serie of TIBO derivates. *Nature*, 1990 ; 343 : 470-474.

**T A B L E D E S  
M A T I E R E S**

# P A R T I E

## B I B L I O G R A P H I Q U E

|  | PAGES |
|--|-------|
| INTRODUCTION   | 9     |
| I - LES DIFFERENTES CIBLES DES AGENTS ANTIRETROVIRAUX                                      | 11    |
| II - LA TRANSCRIPTASE INVERSE  | 14    |
| <u>1°) Les activités enzymatiques de la Transcriptase Inverse.</u>                         | 14    |
| <u>2°) La réplication de la Transcriptase Inverse</u>                                      | 15    |
| <u>3°) Classification des inhibiteurs de la Transcripase Inverse</u>                       | 17    |
| 3-1) Inhibiteurs actifs sur l'enzyme   | 17    |
| 3-2) Inhibiteurs se liant au modèle amorce   | 17    |
| III - LES DIFFERENTS MOYENS D'EVALUATION DE L'ACTIVITE DES ANTIRETROVIRAUX <i>in vitro</i> | 19    |
| IV - METHODES D'ETUDE SUR TAPIS CELLULAIRE   | 21    |
| <u>1°) Evaluation de la cytotoxicité des inhibiteurs.</u>                                  | 21    |
| <u>2°) Evaluation de l'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire</u>                   | 24    |

|   |    |
|---|----|
| <u>3°) Mesure de la viabilité cellulaire</u>                                  | 24 |
| 3-1) Méthode de coloration au MTT et au XTT                                   | 24 |
| a) principe   | 24 |
| b) procédé utilisé  | 25 |
| c) intérêts et limites  | 26 |
| 3-2) Méthode d'exclusion au bleu de trypan                                    | 26 |
| a) principe   | 26 |
| b) méthodologie   | 26 |
| 3-3) Evaluation de la toxicité hématologiques<br>des anti HIV <i>in vitro</i> | 29 |
| a) principe   | 29 |
| b) méthodologie   | 31 |
| c) intérêt  | 31 |
| <u>4°) Effet de l'inhibiteur sur la multiplication virale</u>                 | 32 |
| 4-1) Inhibition de l'ECP  | 32 |
| a) principe   | 32 |
| b) méthodologie   | 32 |
| c) limites  | 33 |
| 4-2) Titrage des particules infectieuses                                      | 33 |
| a) dénombrement des unités infectantes<br>par la méthode des plages           | 33 |
| b) détermination de la dose infectante<br>à 50 % = DI 50.                     | 33 |
| <b>V - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE VIRALE :</b>                           | 37 |
| <u>1°) Mesure de l'activité transcriptase inverse</u>                         | 37 |
| 1-1) Principe   | 37 |
| 1-1-1) description de la méthode  | 37 |
| 1-1-2) les réactifs utilisés  | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 1-2) Les méthodologies utilisées<br>dans les laboratoires   | 41 |
| 1-2-1) <i>le protocole A : purification de la TI</i>  | 43 |
| a) <u>intérêts</u>  | 43 |
| b) <u>techniques de purification</u>  | 43 |
| b-1) <u>l'électrophorèse sur gel</u>  | 43 |
| b-1-1) principe   | 43 |
| b-1-2) procédure d'analyse sur gel<br>F. Lori   | 43 |
| b-2) <u>Chromatographies</u>  | 45 |
| b-2-1) chromatographie d'exclusion sur gel  | 45 |
| b-2-1-1) principe   | 45 |
| b-2-1-2) exemple  | 45 |
| b-2-2) Chromatographie sur résine<br>échangeuse d'ions  | 46 |
| b-2-2-1) principe   | 46 |
| b-2-2-2) séparation des<br>constituants de la TI du VISNA par<br>chromatographie sur DEAE cellulose | 46 |
| b-3) <u>L'ultracentrifugation en gradient<br/>de densité</u>  | 48 |
| b-3-1) principe   | 48 |
| b-3-2) Application à la T.I. du HIV   | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 1-2-2) <i>Protocole B : mesure de l'activité transcriptase inverse :</i> | 53 |
| a) <u>Obtention de l'enzyme rétrovirale</u>                              | 53 |
| b) <u>protocole expérimental</u>   | 53 |
| c) <u>les différentes méthodes de dosage</u>                             | 54 |
| c-1) comparaison des réactifs  | 54 |
| c-2) comparaison des conditions expérimentales                           | 55 |
| c-3) comparaison méthode standard microméthode                           | 55 |
| d) <u>Intérêts et objectifs</u>  | 63 |
| d-1) Sélection de l'activité inhibée                                     | 63 |
| d-2) Sélectivité de l'inhibiteur   | 66 |
| d-3) Quantification de l'activité antirétrovirale                        | 68 |
| d-4) Cinétique de l'inhibition : méthode de Lineweaver - Burk            | 68 |
| <br>   |    |
| 2°) <u>Méthodes de marquage immunologique</u>                            | 71 |
| <br>   |    |
| 2-1) l'immunofluorescence indirecte                                      | 71 |
| <br>   |    |
| 2-2) Essai immunoenzymatique   | 77 |
| 2-2-1) <i>Principe de la technique ELISA</i>                             | 77 |
| 2-2-2) <i>Résultats</i>  | 77 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3°) <u>Etude des synergies d'inhibition</u></b> | <b>77</b> |
| a) intérêts  | 77        |
| b) description de la méthode                       | 78        |
| c) exemple   | 79        |
| <br>   |           |
| <b>CONCLUSION</b>                                  | <b>81</b> |

**P A R T I E**  
**E X P E R I M E N T A L E**

|   | PAGES |
|---|-------|
| INTRODUCTION  | 83    |
| I - MATERIELS ET METHODES   | 84    |
| <u>1°) Culture des cellules</u>   | 84    |
| <u>2°) Culture du virus</u>   | 84    |
| <u>3°) Mise en évidence de l'ECP par coloration au<br/>    May-Gruenwald-Giemsa</u> | 85    |
| <u>4°) Extraction et dosage de la Transcriptase<br/>    inverse.</u>                | 85    |
| II - RESULTATS  | 88    |
| <u>1°) Activité transcriptase inverse des<br/>    deux pools viraux</u>             | 88    |
| <u>2°) Cinétiques</u>   | 90    |
| <u>3°) Dilutions</u>  | 98    |
| III - DISCUSSION  | 102   |
| CONCLUSION  | 106   |

