

UNIVERSITE DE LIMOGES

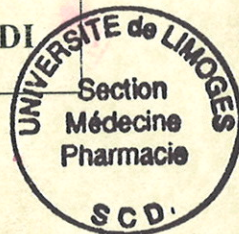
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1997



THESE N° 319 / 1

STRATEGIE ANTIRETROVIRALE
EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE
DE MOLECULES ORIGINALES SUR LE VIRUS VISNA-MAEDI



THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 23 juin 1997

PAR

Denis BAUDOT
né le 13 octobre 1970 à Epernay (Marne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD..... Président
Madame Sylvie DELEBASSEE - Maître de Conférences..... Juge
Monsieur Antoine ORABONA - Pharmacien..... Juge
Madame Sylvie ROGEZ - Praticien Hospitalier..... Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS :Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences**PROFESSEURS :**

| | |
|----------------------|--|
| BENEYTOUT Jean-Louis | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| BERNARD Michel | PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE |
| BOSGIRAUD Claudine | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE |
| BROSSARD Claude | PHARMACOTECHNIE |
| BUXERAUD Jacques | CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| CARDOT Philippe | CHIMIE ANALYTIQUE |
| CHULIA Albert | PHARMACOGNOSIE |
| CHULIA Dominique | PHARMACOTECHNIE |
| DELAGE Christiane | CHIMIE GENERALE ET MINERALE |
| GHESTEM Axel | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE |
| HABRIOUX Gérard | BIOCHIMIE FONDAMENTALE |
| LACHATRE Gérard | TOXICOLOGIE |
| MOESCH Christian | HYGIENE |
| LOUDARD Nicole | PHARMACODYNAMIE |

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Limoges
Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie

Madame, je vous prie de croire que je suis sensible à l'honneur que vous me faites en présidant ce jury. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

A Madame Sylvie DELEBASSEE
Maître de conférence à la Faculté de Pharmacie de Limoges
Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie

Madame, votre soutien a été précieux pour que ce travail arrive à son terme.
Pour les conseils judicieux que vous m'avez prodigués, acceptez toute ma
gratitude.

A Madame Sylvie ROGEZ
Praticien Hospitalier au CHRU de Limoges
Laboratoire de Bactériologie-Virologie

Madame, je vous remercie très sincèrement de l'intérêt que vous me témoignez en acceptant de juger ce mémoire.

A Monsieur Antoine ORABONA
Pharmacien à Limoges

Votre présence est pour moi un soutien dans cette épreuve. Soyez-en remercié.

Je tiens également à adresser mes remerciements

à **Madame Roseline MOUZET**, technicienne au laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges

pour son aide précieuse dans l'utilisation et l'entretien du matériel, ainsi que pour son entrain et sa disponibilité.

à **Mademoiselle Florence MARTHON**

à qui je suis particulièrement reconnaissant pour son écoute et ses encouragements. Je garde un très bon souvenir des moments passés ensemble au cours de nos travaux.

à **Messieurs Jean-Pierre CHOUZENOUX et Pascal FAURY**

pour leur participation spontanée à la reproduction des photos.

à **mes amis et à ma famille**

pour leur aide et leur soutien.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : LE VIRUS VISNA-MAEDI

I - HISTORIQUE

II - EPIDEMIOLOGIE

II . 1 . Répartition géographique

II . 2 . Espèces affectées

II . 3 . Transmission

III - VIROLOGIE

III . 1 . Dimension et morphologie du virus

III . 2 . Ultrastructure

III . 2 . 1 . Nature de l'acide nucléique

III . 2 . 2 . Organisation génomique

III . 2 . 3 . Protéines et enzymes virales

III . 2 . 3 . 1 . Protéines virales

III . 2 . 3 . 1 . 1 . Protéines d'enveloppe

III . 2 . 3 . 1 . 2 . Protéines de capside

III . 2 . 3 . 1 . 3 . Autres polypeptides

III . 2 . 3 . 2 . Enzymes virales

III . 3 . Propriétés physico-chimiques

III . 4 . Tropisme cellulaire

III . 5 . Cycle de multiplication du virus

III . 5 . 1 . Phase de reconnaissance, de fixation, et de pénétration du virus

III . 5 . 2 . Phase d'éclipse

III . 5 . 3 . Phase de production virale

IV - LA MALADIE

IV . 1 . L'incubation

IV . 2 . Le tableau clinique de la maladie

IV . 2 . 1 . La forme MAEDI

IV . 2 . 2 . La forme VISNA

IV . 3 . Anatomo-histopathologie

IV . 3 . 1 . La forme MAEDI

IV. 3. 1. 1. Anatomo-pathologie

IV. 3. 1. 2. Histologie

IV . 3 . 2 . La forme VISNA

IV. 3. 2. 1. Anatomo-pathologie

IV. 3. 2. 2. Histologie

V - IMMUNOPATHOGENESE

VI - DIAGNOSTIC

VI . 1 . Diagnostic clinique

VI . 2 . Diagnostic virologique

VI . 3 . Diagnostic sérologique

VI . 4 . Diagnostic histologique

VII - TRAITEMENT

VIII - PROPHYLAXIE

DEUXIEME PARTIE : RAPPELS SUR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE et STRATEGIE ANTIRETROVIRALE

I - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

I . 1 . Découverte du virus

I . 2 . Diversité des souches de VIH

I . 3 . Virologie

I . 3 . 1 . Dimension et morphologie

I . 3 . 2 . Organisation génomique

I . 3 . 3 . Tropisme cellulaire

I . 3 . 4 . Mécanisme pathogénique

I . 3 . 5 . Cycle de réplication viral

I . 3 . 6 . Importance de la réplication virale

I . 3 . 7 . Variabilité génétique

II - STRATEGIE ANTIRETROVIRALE

II . 1 . Méthode d'évaluation des antirétroviraux

II . 1 . 1 . L'étude *in vitro*

II . 1 . 2 . L'étude *in vivo* chez l'animal

II . 1 . 3 . L'étude *in vivo* chez l'homme ou essais cliniques

II . 2 . Critères d'évaluation de l'efficacité d'un antirétroviral chez l'homme

II . 3 . Médicaments autorisés en pratique clinique

II . 4 . Cibles des antirétroviraux dans le cycle de réplication viral

II . 4 . 1 . Action au niveau de la fixation du virus

II . 4 . 1 . 1 . Le CD4 recombinant et ses dérivés

II . 4 . 1 . 2 . Les composés polyanioniques

II . 4 . 1 . 3 . L'immunothérapie

II . 4 . 2 . Action au niveau de l'étape de fusion/pénétration du virus

II . 4 . 3 . Action sur le processus de décapsidation

II . 4 . 4 . Action au niveau de la rétrotranscription

II . 4 . 4 . 1 . Rappels sur l'enzyme de transcription inverse

II . 4 . 4 . 2 . Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse

II . 4 . 4 . 3 . Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

II . 4 . 5 . Action sur le transfert nucléaire de l'ADN viral

II . 4 . 6 . Action au niveau de l'intégration

II . 4 . 7 . Action au niveau de la transcription

II . 4 . 8 . Action au niveau de la traduction des ARNm en protéines

II . 4 . 9 . Action sur les phénomènes de maturation des protéines virales

II . 4 . 9 . 1 . L'inhibition de la protéase

II . 4 . 9 . 1 . 1 . Rappels sur la protéase du VIH

II . 4 . 9 . 1 . 2 . Les inhibiteurs de la protéase

II . 4 . 9 . 2 . L'inhibition de la glycosylation

II . 4 . 9 . 3 . L'inhibition de la myristylation

II . 4 . 10 . Action sur le processus de bourgeonnement

II . 4 . 11 . Autres niveaux d'action des drogues antirétrovirales

II . 4 . 11 . 1 . Action sur des protéines virales

II . 4 . 11 . 1 . 1 . La protéine NC p7

II . 4 . 11 . 1 . 2 . Les protéines de régulation

II . 4 . 11 . 2 . Action sur des facteurs de la cellule hôte

II . 4 . 11 . 2 . 1 . La ribonucléotide réductase

II . 4 . 11 . 2 . 1 . La cyclophiline A

II . 4 . 11 . 3 . La thérapie génique

II . 4 . 11 . 4 . L'immunomodulation

TROISIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES

I - CULTURE CELLULAIRE

I. 1. Nature et origine des cellules

I. 2. Entretien des cultures

I. 2. 1. Le milieu de culture

I. 2. 2. Le repiquage

1. 2. 2. 1. La trypsination

1. 2. 2. 2. La remise en culture

I. 3. Congélation - décongélation

I. 3. 1. Congélation

I. 3. 2. Décongélation

II - LE VIRUS VISNA-MAEDI

II. 1. Origine

II. 2. Constitution du pool viral

II. 3. Titrage du virus

II. 3. 1. Principe

II. 3. 2. Protocole

III - LE MTT

III. 1. Structure

III. 2. Propriétés physico-chimiques

III. 2. 1. Propriétés physiques

III. 2. 2. Propriétés chimiques

III. 3. Principe de la méthode colorimétrique au MTT

III. 4. Avantages de la méthode colorimétrique au MTT

IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU MTT

IV. 1. Les cellules

IV. 2. Les molécules

IV. 3. Le virus

IV . 3 . 1 . Souche VISNA K 796

IV . 3 . 2 . Souche MAEDI WLC1

IV . 4 . Incubation

IV . 5 . Coloration par la méthode au MTT

IV . 5 . 1 . Préparation de la solution de MTT

IV . 5 . 2 . Mode opératoire

IV . 6 . Lecture des densités optiques

IV . 7 . Détermination de la cytotoxicité des molécules testées

IV . 8 . Détermination de l'activité antivirale des molécules testées

CHAPITRE SECOND : RESULTATS

I - CULTURE DU VIRUS

I . 1 . Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP)

I . 2 . Résultats du titrage

II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE

III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS-A-VIS DES SOUCHES VISNA ET MAEDI

IV - DISCUSSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

La vie sur notre planète présente différents niveaux de complexité d'organisation. Les êtres les plus complexes sont souvent parasités par des êtres plus simples, qui dépendent des premiers pour leur perpétuation et leur survie. **Les virus** sont des éléments de très petite taille (de la dizaine à la centaine de nanomètres), simplement composés d'un programme génétique au sein d'une coque protéique parfois enveloppée. Ils ne sont pas capables de survivre de façon autonome : ils dépendent strictement des cellules d'êtres vivants qu'ils vont parasiter, et qui leur fourniront le matériel métabolique et génétique indispensable à leur réplication.

Tous les êtres vivants, des bactéries jusqu'à l'homme, en passant par les plantes et les animaux, ont des virus qui leur sont propres, mais ceux-ci sont particulièrement nombreux chez les vertébrés à sang chaud. Il existe une quantité importante de virus capables d'infecter l'espèce humaine et d'y induire des maladies souvent graves. Ils sont à l'origine d'environ 60 % des maladies infectieuses connues à ce jour et sont impliqués, pour un petit nombre d'entre eux, dans le développement de cancers (le nombre de cancers d'origine virale est estimé à 15 %).

Les rétrovirus ont longtemps été considérés comme des agents pathogènes touchant uniquement le règne animal. Cette famille de virus se subdivise en trois sous-familles :

- les oncovirus caractérisés essentiellement par leur capacité à induire des cancers,
- les spumavirus dont le rôle pathogène n'est pas connu,
- les lentivirus qui tirent leur nom de leur caractéristique à entraîner des infections virales lentes

et progressives. Le virus **VISNA-MAEDI** représente le prototype des lentivirus, il est à l'origine du concept de « virus lents » évoqué pour la première fois en 1954 par SIGURDSSON.

L'intérêt pour les rétrovirus s'est accru avec la découverte, en 1978, du premier oncovirus associé à une pathologie humaine et responsable de leucémie, le **HTLV I** (Human T-cell leukemia virus type I). Mais c'est surtout l'isolement en 1983, par l'équipe du Professeur MONTAGNIER, du premier lentivirus humain, le **virus de l'immunodéficience humaine (VIH)** responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), qui marque un tournant dans l'intérêt porté à la famille des rétrovirus. L'infection par le VIH pose un véritable problème en terme de santé publique ; la recherche de composés présentant une activité antirétrovirale, et plus particulièrement anti-VIH, qui soient à la fois efficaces et non toxiques, reste toujours aujourd'hui une urgence. En effet, malgré des progrès certains depuis la découverte du VIH, l'arsenal thérapeutique se réduit à huit molécules en pratique clinique ; leurs effets demeurent incomplets et transitoires, surtout en monothérapie, et leur

toxicité n'est pas toujours anodine. Plus que jamais, les efforts se poursuivent avec des axes de recherche multiples. D'une part, par l'approfondissement des connaissances sur le virus, ses mécanismes de réplication et sa relation avec le système hôte, qui permet de mettre à jour de nouvelles cibles thérapeutiques et d'orienter la conception de nouveaux antirétroviraux. D'autre part, par l'évaluation de l'activité antirétrovirale d'un très grand nombre de composés, que ce soit par un criblage aveugle, sachant que la probabilité d'obtenir des molécules intéressantes par cette méthode est très faible, ou par le criblage de composés sélectionnés, issus d'une recherche orientée sur une cible particulière bénéficiant d'un certain niveau de connaissances.

Une présélection est devenue nécessaire parmi la pléthore de molécules produites chaque année dans le monde entier, la grande majorité d'entre elles se révélant inefficace contre la réplication du VIH. L'utilisation d'un virus proche du VIH, et non pathogène pour l'homme, peut représenter un modèle potentiel pour l'évaluation *in vitro* de composés susceptibles d'être actifs sur le VIH. Le virus VISNA-MAEDI, bien que non immunosuppresseur, a été proposé pour plusieurs raisons. Il appartient comme le VIH à la sous-famille des lentivirus. Tous deux possèdent de nombreuses similitudes dans les séquences et l'organisation de leur génome, dans leur pathogénèse et leurs caractéristiques réplcatives (148, 40). De plus, ils présentent des sensibilités communes à l'inhibition *in vitro* (72, 182). Pour ces raisons, nous avons choisi le virus VISNA-MAEDI pour la réalisation de notre travail expérimental.

Cette étude comporte trois parties. Dans la première, nous dressons un bilan des connaissances actuelles sur le virus VISNA-MAEDI. Ensuite, après avoir rappelé quelques données essentielles concernant le VIH, ainsi que les grandes étapes de l'évaluation de l'intérêt de composés à visée antivirale, nous passons en revue les différentes cibles potentielles d'action des antirétroviraux dans le cycle de réplication viral. Ces différents niveaux d'action sont plus particulièrement développés à travers le cas du VIH. Enfin, la troisième partie présente et discute les résultats de nos expérimentations personnelles portant sur l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antivirale de molécules originales sur le virus VISNA-MAEDI.

PREMIERE PARTIE
LE VIRUS VISNA-MAEDI

Le virus VISNA-MAEDI est un rétrovirus de la sous-famille des *Lentivirinae* (71) (tableau1). Il est l'agent responsable de deux infections contagieuses affectant les ovins et les caprins. La maladie se caractérise :

- soit par une **pneumonie interstitielle** d'évolution lente et progressive dans la forme MAEDI (terme qui signifie "dyspnée" en islandais).
- soit par une **encéphalopathie** d'évolution également lente, dans la forme VISNA (terme signifiant "déperissement") (24).

I - HISTORIQUE :

En 1923 furent décrits pour la première fois dans l'état du Montana (U.S.A.) des cas de pneumonie interstitielle chronique sévère entraînant l'épuisement puis la mort des moutons atteints (117).

Dans les années 38-39, survinrent en Islande de nombreux cas de pneumonie progressive du mouton appelée pour cette raison MAEDI (essoufflement). Des études épidémiologiques montrèrent alors que le développement de la maladie était consécutif à l'importation en 1933 de 20 béliers Karakul en provenance d'Allemagne (199). Dans les mêmes troupeaux où sévissait le MAEDI, on observa également des signes neurologiques d'encéphalite chronique. Ces troubles furent désignés par le terme VISNA (déperissement).

Durant cette période, MAEDI et VISNA firent l'objet d'intenses études épidémiologiques, pathologiques, virologiques, et c'est en 1954 que l'Islandais SIGURDSSON (172) mit en cause une étiologie virale et définît le concept de "maladies à virus lents". Ces maladies se caractérisent en effet par une longue période d'incubation, s'étalant sur plusieurs mois voire plusieurs années, ainsi que par un développement progressif des signes cliniques. Par la suite, la maladie fut identifiée dans de nombreux autres pays (24) :

- en Hollande notamment, où la Zwoergerziekte fut signalée la première fois en 1918 et dont les études ultérieures (cliniques, histologiques et virologiques) ont montré en 1968 qu'il s'agissait bien du MAEDI,
- aux Etats-Unis où la "maladie du mouton du Montana" fut également reconnue en 1968 comme étant due au MAEDI,

| | | Espèce infectée | Pouvoir pathogène |
|---|---------------|---------------------------------|--|
| <u>ONCOVIRUS</u> identifiés selon le néoplasme qu'ils induisent | HTLV I..... |Homme | Oncogénèse |
| | HTLV II..... |Homme | |
| | FeLV..... |Félins | |
| | BLV..... |Bovins | |
| <u>LENTIVIRUS</u> associés à des maladies à évolution lente | HIV-1..... |Homme | } Syndrome immunodéficientaire |
| | HIV-2..... |Homme | |
| | SIV..... |Simiens | |
| | FIV..... |Félins | |
| | BIV..... |Bovins | ? |
| | VISNA-MAEDI.. | ..Ovins++, Caprins | Troubles nerveux et pulmonaires |
| | CAEV..... |Caprins | Troubles articulaires, nerveux, pulmonaires et mammaires |
| EIAV..... |Equins | Anémie infectieuse | |
| <u>SPUMAVIRUS</u> | | Pratiquement toutes les espèces | Inconnu |

Tableau 1 : classification des rétrovirus ; principaux représentants et pouvoir pathogène.

- en France où LUCAM décrivait en 1942 une pneumonie progressive du mouton landais plus communément appelée la Bouhite.
- en Allemagne et au Canada (1970), en Hongrie (1973), au Danemark et en Norvège (1974), en Suède et en Inde (1975), en Grande-Bretagne (1979), etc...

La maladie induite par le MAEDI a souvent été confondue avec l'adénomatose pulmonaire (ou pneumonie catarrhale chronique) observée en Afrique du Sud dès 1915 par MITCHELL. Cette confusion provenait apparemment du fait que certains moutons présentaient à la fois les deux maladies (47). En fait, ces deux affections sont très différentes, la première étant une maladie lymphoproliférative liée à un virus non oncogène et la deuxième, une maladie carcinomateuse.

II - EPIDEMIOLOGIE :

II . 1 . Répartition géographique :

Comme nous l'avons vu dans l'historique, la répartition du virus VISNA-MAEDI est mondiale. On le rencontre sous tous les climats et pratiquement sur tous les continents : pourtant la maladie n'a jamais été décrite en Australie, malgré une population ovine très importante (138).

Dans différents pays (Danemark, Norvège, Suède, Hongrie, Canada ...) la maladie est, comme en Islande, consécutive à l'importation de moutons.

Cette affection ayant été découverte dans diverses régions, elle a reçu différents noms, évoquant souvent le symptôme dominant (ainsi, en France, on a parlé de Bouhite, vieux mot du patois landais signifiant soufflet) et parfois le lieu où elle sévissait (aux USA, la première appellation a été pneumonie du mouton du Montana).

II . 2 . Espèces affectées :

Le virus VISNA-MAEDI est un lentivirus qui n'affecte que les ovins et les caprins, les caprins étant cependant bien moins souvent atteints que les ovins. L'homme n'est pas sensible au virus, et la consommation de

viande de mouton infecté ne semble pas dangereuse pour lui.

Des études sérologiques ont montré une plus forte séroprévalence ainsi qu'une incidence plus élevée des manifestations cliniques chez certaines espèces ovines (Border Leicester, Finnisch Landrace et Texel) que chez d'autres (Suffolk, Hampshire et Dorset) (199).

Plus récemment, il a été démontré que le taux d'infection dans ces deux groupes reste identique, suggérant ainsi une prédisposition génétique non pas à l'infection mais au développement des signes cliniques (101).

D'autre part, la prévalence de la maladie augmente avec l'âge de l'animal : les ovins sont plus sensibles à un âge avancé qu'au début de leur vie (2-3 ans). La présence de lésions mammaires (les mammites sont fréquemment associées aux autres symptômes de la maladie) est également plus rare chez les jeunes brebis, ce qui pourrait expliquer pourquoi elles infectent moins leur progéniture (92).

II. 3 . Transmission :

La transmission du virus VISNA-MAEDI se fait à la fois **horizontalement** (entre congénères) et **verticalement** (à la descendance).

La transmission horizontale s'effectue par l'inhalation d'exsudats respiratoires contenant le virus et/ou des cellules infectées par celui-ci. La transmission par cette voie est accrue par la coexistence d'autres agents infectieux entraînant une augmentation des sécrétions pulmonaires (le virus de l'adénomatose pulmonaire par exemple) et par les conditions d'élevage concentrant les animaux dans un endroit clos et ce particulièrement pendant la période hivernale (199).

A ce jour, il n'a pas été mis en évidence de transmission sexuelle du virus.

La contamination de l'agneau par le colostrum maternel renfermant des macrophages infectés est le principal mode de transmission verticale. Elle est favorisée par l'apparition de mammites. Cependant, l'incidence de l'infection dans le troupeau diminue lorsque l'on sépare les jeunes animaux des mères infectées dès la naissance

(33). La transmission *in utero* à travers la barrière placentaire ou par les cellules germinales est possible mais rare

(46). Dans le cas d'une transmission prénatale, il semble alors que les brebis soient plus jeunes et qu'elles n'aient eu que peu de grossesses (27).

III - VIROLOGIE :

C'est en 1960 que le virus VISNA est isolé pour la première fois en culture cellulaire, par SIGURDSSON et ses collaborateurs, à partir du cerveau d'un mouton atteint par la maladie (173).

Quelques années plus tard, en 1964, SIGURDARDOTTIR met également en évidence un virus dans le poumon d'un animal infecté par le MAEDI (171).

III . 1 . Dimension et morphologie du virus : (190) (figure 1)

Le virus VISNA-MAEDI apparaît au microscope électronique sous la forme de particules sensiblement sphériques de 110 à 150 nm de diamètre.

Il est constitué d'un nucléoïde central d'environ 50 nm, dense aux électrons, entouré d'une enveloppe dérivée de la membrane de la cellule hôte. Cette enveloppe externe mesure environ 6 nm d'épaisseur, et est hérissée de spicules glycoprotéiques de 8 à 12 nm de long.

III . 2 . Ultrastructure :

III . 2 . 1 . Nature de l'acide nucléique : (190)

La particule virale contient deux molécules d'ARN monocaténaire, chacune comprenant:

- un composant principal ayant un coefficient de sédimentation compris entre 60 et 70 S,
- un composant mineur de faible coefficient de sédimentation (4 S).

L'ARN 60-70 S est constitué de deux sous-unités de 36 S, de séquences identiques et de poids moléculaire $3 \cdot 10^6$ daltons, associées par des liaisons non covalentes au niveau des extrémités 5'.

III.2.2. Organisation génomique : (figure 2)

Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par la complexité de leur génome.

En commun avec tous les rétrovirus, le virus VISNA-MAEDI contient les trois séquences majeures : **gag**, **pol** et **env**. A côté de ces gènes essentiels, il présente des cadres de lecture supplémentaires, **vif**, **tat** et **rev**, qui influencent l'expression génétique virale, la maturation des ARN, et l'infectivité.

◆ Les trois gènes principaux, **gag**, **pol** et **env**, codent pour des précurseurs qui sont ensuite clivés en protéines de structure (138). Ainsi :

⇒ le **gène gag** (group associated antigen) d'environ 1350 nucléotides, code pour les protéines internes de la nucléocapside. Il semble nécessaire à l'assemblage et à la libération des particules virales (155). La structure des protéines Gag joue un rôle important pour l'entrée du virus dans la cellule et la libération du core ainsi que l'importation du complexe de préintégration dans le noyau.

⇒ le **gène** suivant appelé **pol** (polymérase), long de 3315 nucléotides, code pour les protéines virales, essentielles à la réplication et à la maturation : transcriptase inverse, endonucléase/intégrase et protéase.

Ces deux premiers gènes se chevauchent dans le génome.

⇒ Le **gène env** (enveloppe) constitue un troisième cadre de lecture de 2952 nucléotides. Ce gène code pour les deux protéines d'enveloppe (une protéine de surface SU et une protéine transmembranaire TM) nécessaires à la liaison du virus au récepteur cellulaire, à sa neutralisation, et à sa fusion.

◆ A côté de ces cadres de lecture, le génome du virus VISNA-MAEDI renferme trois petits gènes supplémentaires, codant pour des protéines régulatrices de la transcription (170, 85, 138, 184) :

⇒ le premier de ces gènes est le **gène vif** (viral infectivity factor) long de 690 nucléotides. Il est commun à tous les lentivirus excepté l'EIAV (34). Il semble réguler l'expression virale à la fin de la réplication, pendant la formation des virions, par son action modulatrice positive de l'infection lentivirale (70). Il

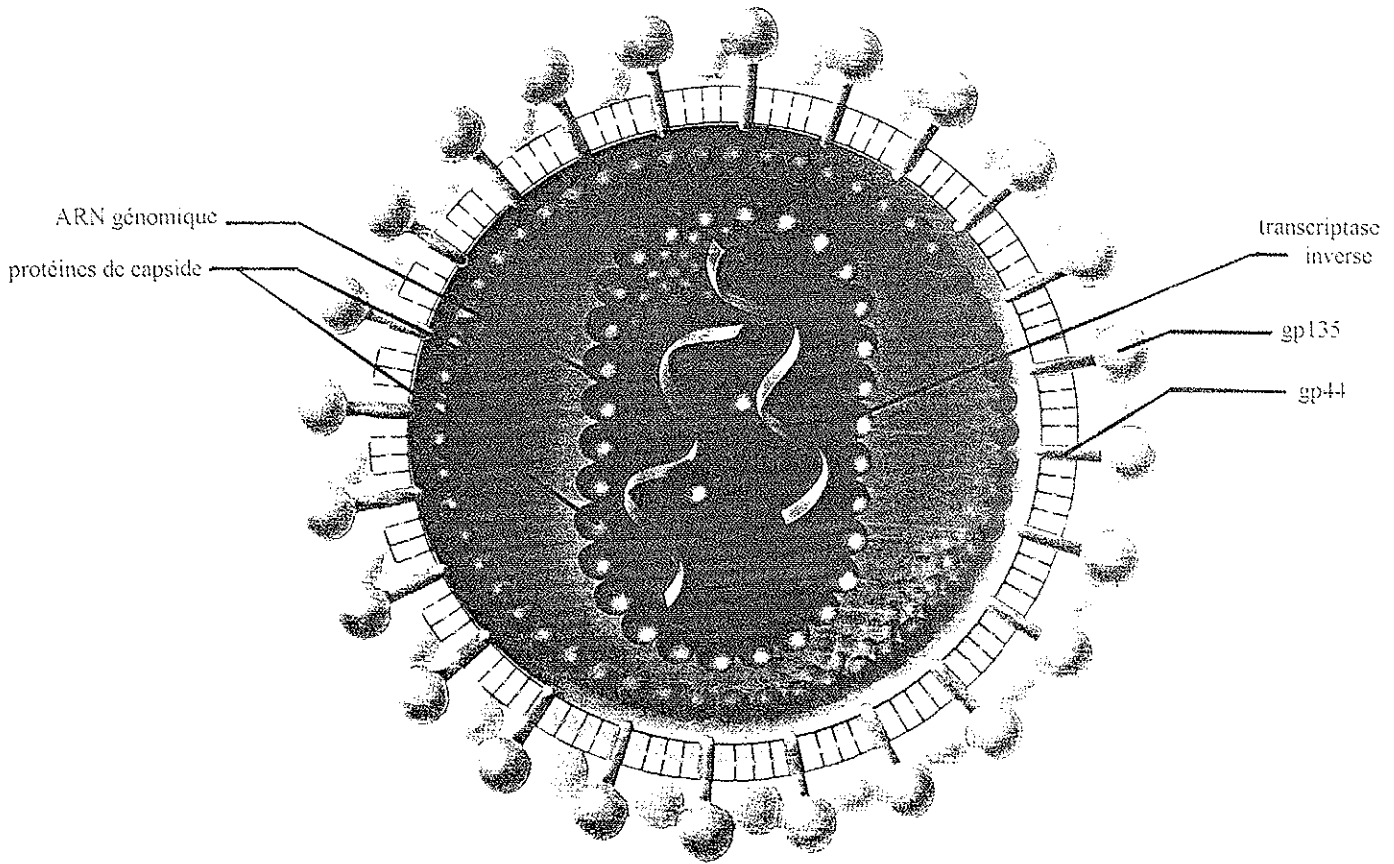


Figure 1 : représentation schématique du virus VISNA-MAEDI (152).

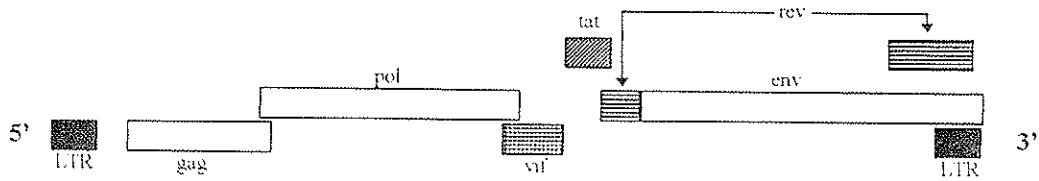


Figure 2 : organisation génomique du virus VISNA-MAEDI (76).

est capable d'augmenter l'infectivité des particules virales, mais cette fonction est dépendante du type cellulaire infecté (34).

⇒ le **gène régulateur tat** (trans activator of transcription) est situé immédiatement après vif. Il est présent chez tous les lentivirus et long de 288 nucléotides. Il code pour une protéine trans-activatrice de l'expression virale.

⇒ enfin, le **gène rev** (regulator of expression of virion proteins) comprend deux séquences : l'une située en 3' du gène env et l'autre en 5' de ce même gène. Ce gène, également retrouvé chez tous les lentivirus, est présent dans le noyau des cellules infectées. Cependant, des études récentes ont démontré sa capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (96, 48). Il code pour une protéine nécessaire à l'expression des protéines de structure car elle permet le transport des ARN messagers (ARNm) incomplètement épissés du noyau vers le cytoplasme.

◆ A chaque extrémité du génome, des **séquences répétitives** ou **LTR** (long terminal repeat) constituées de 414 paires de bases, jouent également un rôle essentiel. Elles assurent un contrôle de la transcription et de l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire. Elles contiennent aussi les signaux nécessaires à la régulation des ARNm et à l'encapsidation des ARN viraux.

III. 2. 3. Protéines et enzymes virales : (138)

III. 2. 3. 1. Protéines virales :

III.2.3.1.1. **Protéines d'enveloppe :**

On distingue :

⇒ une **glycoprotéine de surface, gp135** (de poids moléculaire 135000), qui détermine le tropisme cellulaire du virus. Elle porte les déterminants antigéniques qui seront les cibles des anticorps neutralisants et des cellules T cytotoxiques dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus,

⇒ une **glycoprotéine transmembranaire, gp44**, qui participerait, quant à elle, au processus de pénétration du virus dans la cellule hôte.

III.2.3.1.2. Protéines de capsid :

Ces protéines de structure, codées par le gène gag, sont au nombre de trois : **p14**, **p16**, et **p27**.

La protéine majeure de cette capsid est la protéine p27, elle présente le déterminant antigénique caractéristique des lentivirus.

III.2.3.1.3. Autres polypeptides :

Parmi ces derniers sont classées les protéines issues des gènes vif, tat, et rev. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'infectiosité du virus et de l'expression génétique virale.

III. 2. 3. 2. Enzymes virales :

La première enzyme est la **transcriptase inverse**, c'est-à-dire une ADN polymérase ARN dépendante. Cette enzyme est un constituant clé dans le cycle de répllication des rétrovirus ; c'est elle qui transcrit l'ARN en ADN monocaténaire puis bicaténaire, formant ainsi un provirus, susceptible de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Les propriétés de cette enzyme font du virus VISNA-MAEDI un lentivirus typique : en effet, son activité dépend strictement de la présence dans le milieu d'un cation métallique divalent, avec une nette supériorité de l'ion Mg^{2+} par rapport à l'ion Mn^{2+} (ce dernier est au contraire nécessaire à l'activité de certains oncovirus).

La deuxième enzyme est une **protéase** dont l'activité protéolytique est essentielle pour la production de virions infectieux.

La troisième enzyme possède une activité **endonucléasique / intégrasique**. Elle est capable d'introduire des coupures sur la chaîne d'ADN circulaire et participe également au mécanisme d'association du génome viral avec celui de la cellule hôte.

III . 3 . Propriétés physico-chimiques : (181)

Le virus VISNA-MAEDI est inactivé par l'éther éthylique, le chloroforme, l'éthanol, le phénol, le formaldéhyde, et la trypsine.

La lumière ultra-violette lui fait également perdre sa virulence.

Assez fragile dans le milieu extérieur, il se conserve plusieurs mois à -50°C. Il est inactivé en 10 à 15 minutes à +50°C.

Le virus est inactivé rapidement à pH <4,2. L'infectiosité est relativement stable lorsque le pH est compris entre 5,1 et 10, et plus stable à un pH légèrement alcalin.

Enfin, le VISNA-MAEDI n'est ni hémadsorbant, ni hémagglutinant.

III . 4 . Tropisme cellulaire : (199, 43)

Les cellules cibles du virus VISNA-MAEDI sont essentiellement **les cellules de la lignée monocytes / macrophages**. Au départ, seuls quelques monocytes et promonocytes issus de la moelle sont infectés : la réplication virale dans ces cellules est limitée et le virus reste sous la forme d'ADN proviral. Au cours de la maturation et de la différenciation des monocytes en macrophages, la sensibilité à l'infection est augmentée (par augmentation du nombre de récepteurs viraux) et la production de certains facteurs cellulaires stimule la transcription virale.

Cependant, s'il est clairement établi aujourd'hui que la principale cible du lentivirus ovin est bien la lignée monocyttaire, d'autres cellules peuvent également être infectées *in vivo* : c'est le cas des lymphocytes (le pourcentage de lymphocytes infectés reste malgré tout assez faible et la réplication virale au sein de ces cellules semble non productive) et de certaines cellules du système nerveux central telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes de plexus choroïdes (PC), les astrocytes et les oligodendrocytes de la substance gliale. Le ou les récepteurs d'entrée du virus dans ces cellules ne sont pas connus. Cependant, la capacité du virus à se répliquer dans une large gamme de cellules suggère qu'il utilise, soit une molécule très commune, soit différents récepteurs.

III . 5 . Cycle de multiplication du virus :

Ce cycle présente les caractères généraux de répllication des *Retroviridae* (82) (figure 3).

Il se divise en trois grandes étapes :

- une phase de **reconnaissance**, de **fixation** et de **pénétration du virus**.
- une phase **d'éclipse**.
- une phase de **production virale**.

III . 5 . 1 . Phase de reconnaissance, de fixation, et de pénétration du virus :

Le virus VISNA-MAEDI reconnaît des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible, puis adhère à la surface de cette cellule par interaction entre sa glycoprotéine d'enveloppe gp135 et le récepteur.

Puis le virus pénètre dans la cellule par un phénomène de pinocytose : sa capsid est dégradée, libérant ainsi le nucléoïde dans le cytoplasme (figures 4, 5 et 6).

III . 5 . 2 . Phase d'éclipse :

Dans le cytoplasme, après décapsidation, l'ARN parental est transcrit en ADN grâce à une ADN polymérase ARN dépendante (ou transcriptase inverse). Le matériel génétique du lentivirus VISNA-MAEDI est constitué de deux molécules simples brin d'ARN et chacune des molécules génomiques est associée à une molécule de transcriptase inverse.

Il y a formation d'un hybride ARN-ADN qui sert de modèle à la synthèse d'un ADN bicaténaire, transporté dans le noyau. Cet ADN linéaire va alors s'intégrer au génome de la cellule hôte par l'intermédiaire de son endonucléase : l'ADN viral ainsi associé à l'ADN cellulaire est transmis aux cellules filles lors de la mitose, permettant ainsi la propagation du virus à l'abri des défenses de l'hôte. On parle alors de provirus et cette phase de

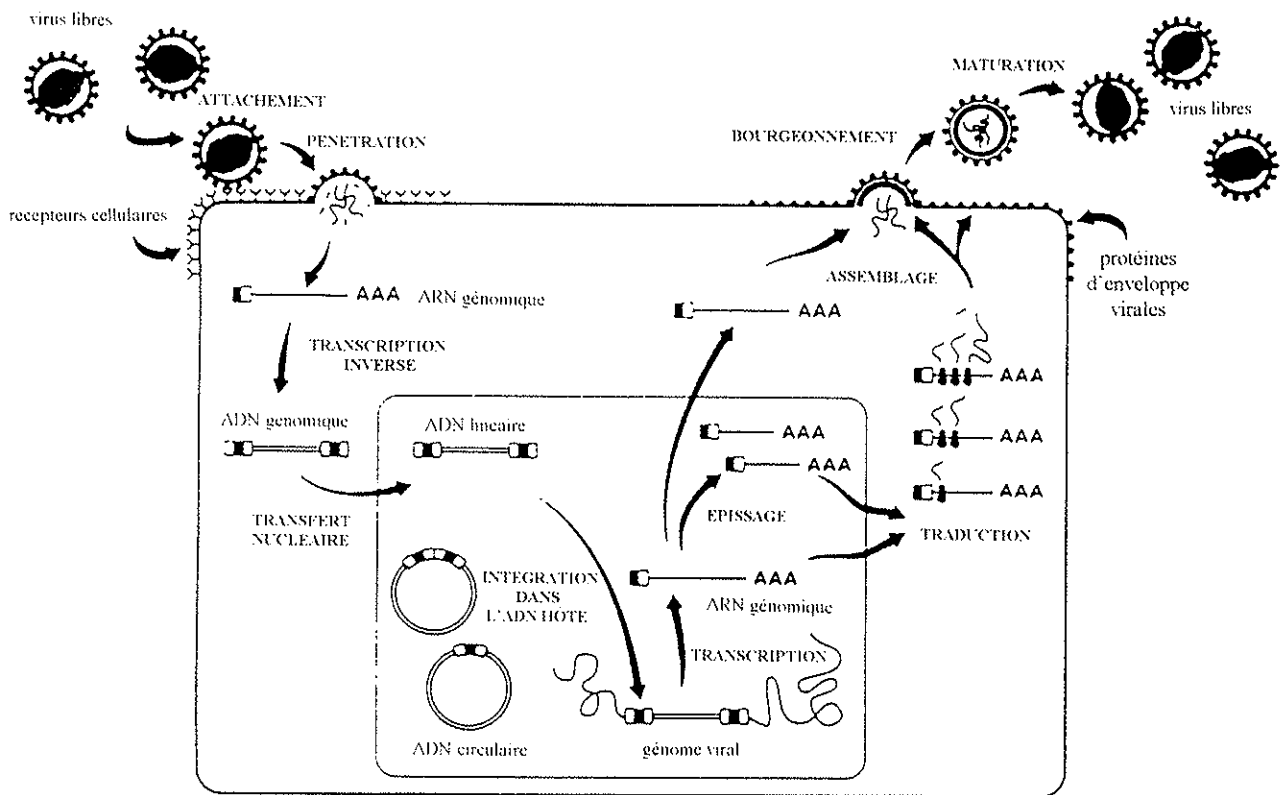


Figure 3 : cycle de réplication des lentivirus (82).

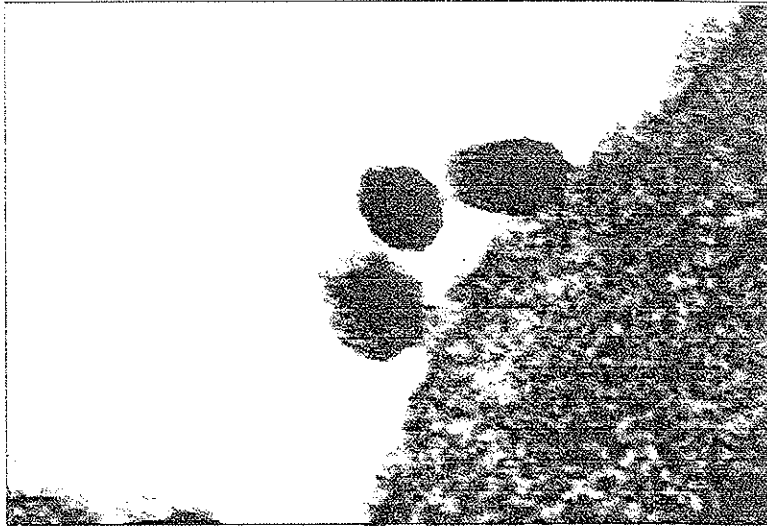


Figure 4 : attachement du virus VISNA-MAEDI à la surface d'une cellule (23).
(x 100.000)



Figure 5 : entrée du VISNA-MAEDI dans la cellule par pinocytose (23).
(x 100.000)

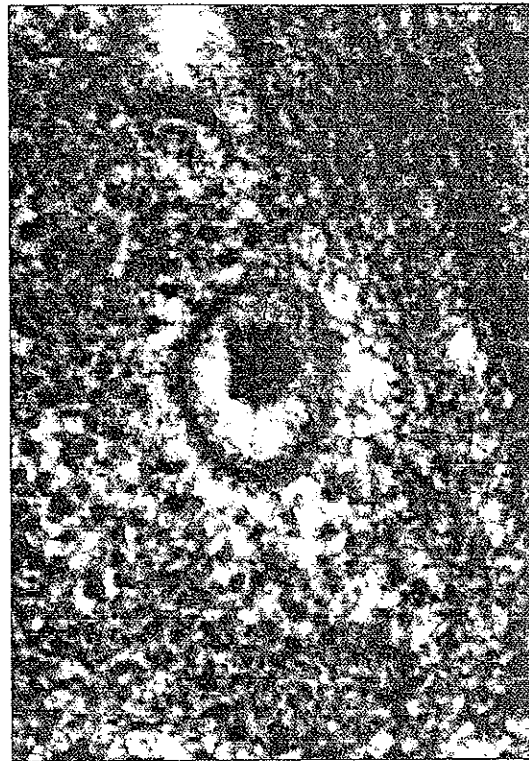


Figure 6 : virus VISNA-MAEDI intracellulaire (23).
(x 100.000)

latence peut se poursuivre jusqu'à ce que des facteurs extérieurs ou des signaux physiologiques induisent la reprise de la transcription.

A la faveur d'une activation, le virus va donc se "réveiller" : la transcription peut commencer, donnant d'une part un ARN viral monocaténaire et d'autre part des ARNm qui, liés aux polyribosomes cytoplasmiques, seront traduits en différentes protéines virales.

III. 5. 3. Phase de production virale :

A la fin de la synthèse protéique, les différents constituants viraux s'assemblent autour des molécules d'ARN génomique.

Cet ensemble migre ensuite vers la membrane cytoplasmique, et le virion est expulsé par bourgeonnement, hors de la cellule où il va subir des processus de maturation (figures 7, 8 et 9).

IV - LA MALADIE :

Sur le plan clinique, **trois caractéristiques** de la maladie sont **essentiels** :

- l'incubation est très longue.
- parmi les animaux infectés, très peu développent des signes cliniques.
- les animaux qui extériorisent la maladie évoluent inexorablement vers la mort.

IV. 1. L'incubation :

Dans les conditions naturelles, il est difficile de chiffrer avec exactitude la durée précise de l'incubation. Cependant, les signes cliniques de la forme MAEDI n'apparaissent jamais avant l'âge de 3 ou 4 ans et ceux de la forme VISNA avant l'âge de 2 ans (24).

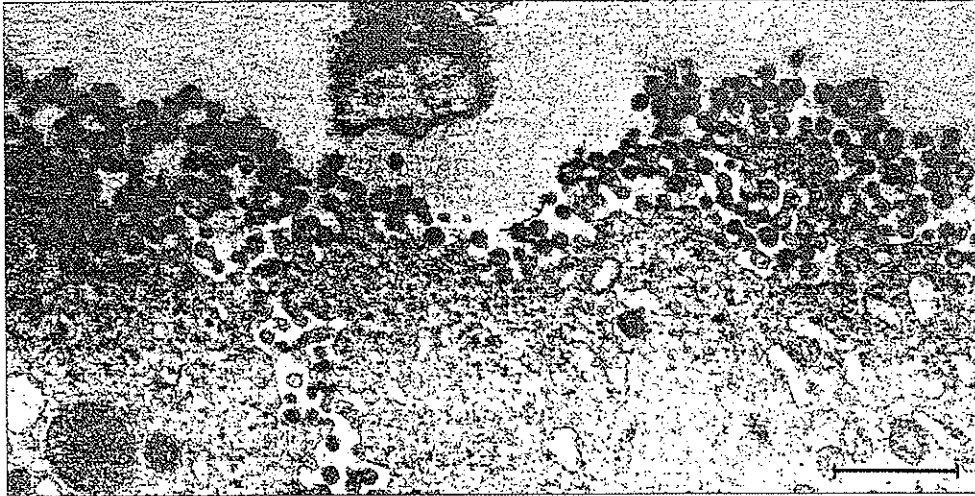


Figure 7 : bourgeonnement et libération d'un grand nombre de virus VISNA-MAEDI immatures à la surface d'une cellule infectée (139).
(la barre représente 1 μm)

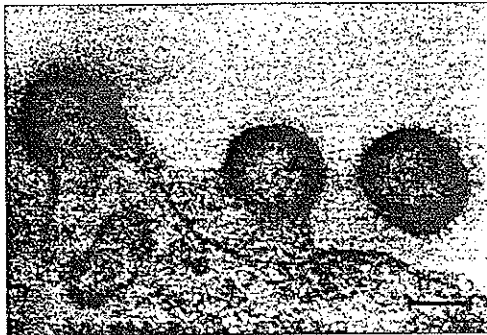


Figure 8 : bourgeonnement et libération de virus VISNA-MAEDI (139).
(la barre représente 100 nm)

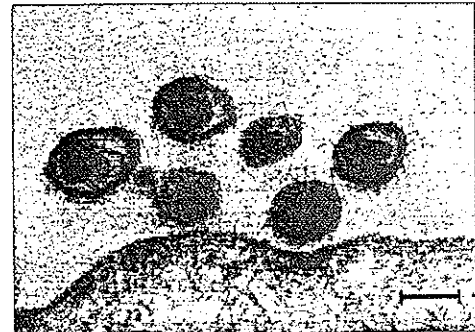


Figure 9 : virus VISNA-MAEDI mature avec capsidie pléomorphe (139).
(la barre représente 100 nm)

IV . 2 . Le tableau clinique de la maladie :

IV . 2 . 1 . La forme MAEDI : (199, 164, 147)

Les premiers signes sont d'abord discrets et peu évocateurs : l'éleveur constate que son animal manque de vigueur et qu'il présente une toison en mauvais état. Apparaît ensuite une gêne respiratoire à l'effort : la fréquence respiratoire est anormalement élevée et l'évolution se fait progressivement vers une polypnée permanente, observée même au repos. Cette évolution est totalement apyrétique. Le jetage est absent et la toux sèche inconstante. Malgré un bon appétit, l'animal devenu cachectique ne se lève plus et succombe en anoxie, généralement à la suite de surinfections bactériennes.

La phase clinique peut durer plusieurs mois, parfois plus d'une année (en moyenne 3 à 8 mois). L'évolution fatale est notablement accélérée en cas de gestation, d'allaitement, ou de maladies intercurrentes microbiennes ou parasitaires.

IV . 2 . 2 . La forme VISNA : (24)

Elle est définie comme une leucoencéphalite enzootique ovine, maladie démyélinisante lente, à évolution toujours fatale.

Comme pour la forme MAEDI, on note au départ une altération de l'état général. Le mouton traîne à l'arrière du troupeau et tombe parfois sans raison. Une légère anomalie de la démarche s'observe au niveau du train postérieur, lorsque l'animal est amené à trotter. Progressivement la faiblesse des membres postérieurs s'accroît et la perte de poids s'accroît. Le phénomène est souvent plus marqué d'un côté, et l'animal laisse le membre atteint traîner vers l'arrière. On observe parfois un tremblement au niveau des lèvres et des muscles faciaux, et les mammites sont des complications observées quelquefois chez les brebis. La parésie progresse lentement vers une paralysie complète. L'état général de l'animal se détériore inéluctablement.

L'évolution clinique, là aussi apyrétique, dure de quelques semaines à plus d'un an. La mort survient après une période de coma.

IV . 3 . Anatomohistopathologie :

IV . 3 . 1 . La forme MAEDI :

IV . 3 . 1 . 1. Anatomopathologie : (164)

A l'ouverture de la cage thoracique du mouton, le signe le plus frappant est l'augmentation considérable du volume et du poids (multiplié par 2 ou 3) des poumons. Ces derniers ne s'affaissent pas et présentent une couleur homogène gris-jaunâtre ou gris-bleuté. Leur consistance est ferme mais garde une certaine élasticité (on parle de "consistance de caoutchouc").

La trachée et les grosses bronches demeurent normales. Les ganglions lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux sont par contre nettement hypertrophiés, pâles, oedémateux et de coupes homogènes.

IV . 3 . 1 . 2. Histologie : (199, 135)

L'examen histologique révèle une pneumonie interstitielle avec hyperplasie lymphoïde. Les cloisons interalvéolaires sont épaissies et infiltrées par des cellules mononucléées, surtout des lymphocytes. L'hyperplasie lymphoïde concerne tout le poumon, mais elle est plus marquée au voisinage des bronches et des bronchioles.

Des altérations identiques (infiltration de cellules mononucléées, formation de manchons périvasculaires) ont également été observées au niveau des mamelles de brebis infectées.

IV . 3 . 2 . La forme VISNA :

IV . 3 . 2 . 1. Anatomopathologie :

Dans la plupart des cas, on n'observe aucune lésion macroscopique. Cependant, lorsque la maladie évolue sur une longue période, on peut noter une atrophie musculaire très importante sur l'un des membres postérieurs, voire sur les deux.

IV. 3. 2. 2. Histologie : (199, 75)

Les lésions sont celles d'une démyélinisation et d'une destruction de la substance blanche dans le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Elles ont été décrites en détail par SIGURDSSON et coll., surtout sur des sujets atteints de la maladie expérimentale. Ces lésions sont tout d'abord de nature inflammatoire puis dégénérative.

La lésion primaire paraît se situer sur la névroglie. L'inflammation progresse avec régularité, partant de l'épendyme (ventricules cérébraux, aqueduc de Sylvius, canal épendymaire de la moelle) pour s'étendre ensuite en profondeur dans le parenchyme où l'infiltration lymphocytaire s'accompagne d'astrocytose (figure 10).

Dans les stades avancés, c'est la démyélinisation, puis la destruction de la substance blanche de l'encéphale, du bulbe, de la moelle qui domine. Certaines zones de démyélinisation montrent, en leur centre, une nécrose de liquéfaction.

Avant même l'apparition des premiers symptômes, on observe dans le liquide céphalo-rachidien et le liquide épendymaire, une pleïocytose prononcée (40 à 2000 cellules mononucléées / ml avec essentiellement des lymphocytes).

V - IMMUNOPATHOGENESE : (199, 77)

Un grand nombre d'animaux infectés ne présente pas un taux d'anticorps détectable ou alors développe une réponse humorale tardive. Ceci est lié à la capacité du virus à rester latent dans les cellules hôtes immatures. En l'absence d'expression virale antigénique, l'organisme est en effet incapable de détecter le virus ; la moelle joue donc le rôle d'un réservoir de virus qui déverse continuellement dans le sang périphérique des monocytes infectés, lesquels se retrouvent par chimiotactisme au niveau des tissus cibles. Quand les cellules deviennent matures dans ces tissus, le système immunitaire de l'animal est exposé à l'antigène viral ; cependant, les anticorps produits n'entraînent pas la disparition du virus ni une amélioration des signes cliniques et ceci semble en partie s'expliquer par le fait que la propagation du virus d'une cellule à l'autre est plus rapide que la cinétique de neutralisation.

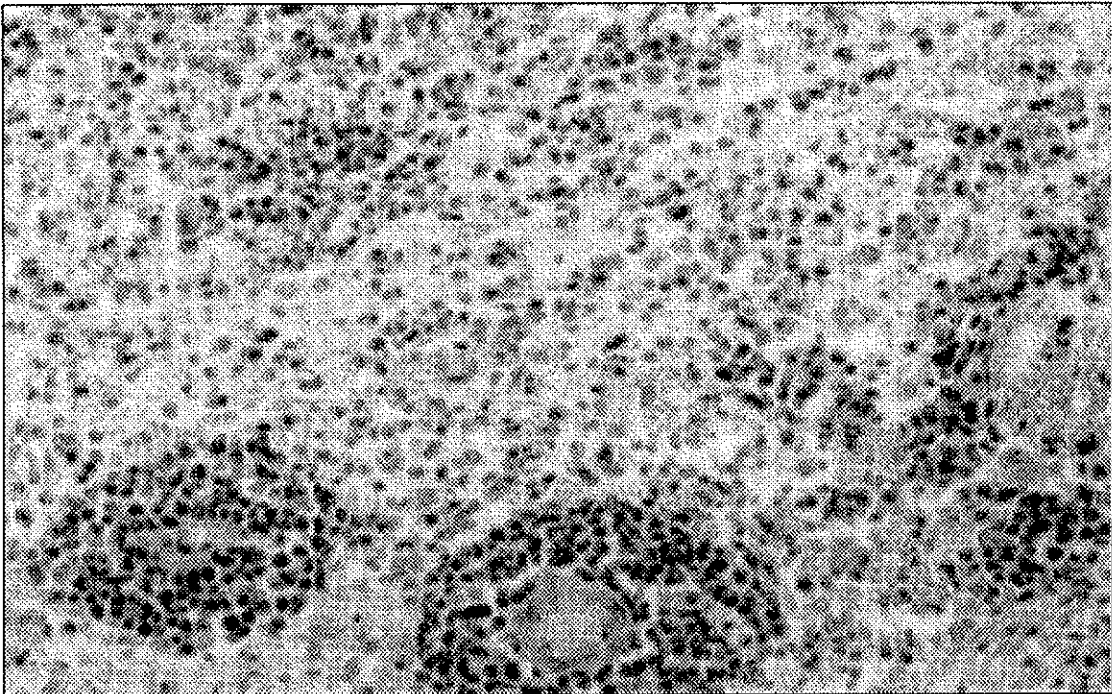


Figure 10 : intense inflammation de la substance blanche cérébrale avec d'importants infiltrats périvasculaires (x 240) (77).

D'un autre côté, les cultures cellulaires comme les études *in vivo* démontrent que l'interaction entre les macrophages infectés et les lymphocytes se traduit par la production d'un interféron LV-IFN. Cet interféron induit l'expression d'antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité sur les macrophages : ceci augmente la présentation d'antigènes viraux aux lymphocytes T helper qui sécrètent alors une grande variété de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines possèdent une activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes et des lymphocytes du sang périphérique et contribuent donc à l'intense inflammation dans les tissus infectés.

VI - DIAGNOSTIC :

VI. 1. Diagnostic clinique :

Il est souvent difficile compte tenu de la superposition dans un même troupeau de pathologies d'étiologies diverses (parasitaires, bactériennes ou virales).

◆ Ainsi, la forme MAEDI peut être confondue avec d'autres affections cachectisantes présentant également des symptômes pulmonaires (164) :

→ l'adénomatose pulmonaire se différencie par la présence de râles humides ; le jetage non purulent est abondant, la toux est grasse et la fièvre a un caractère constant.

→ la tuberculose ovine, la strongylose, les broncho-pneumonies infectieuses et les mycoplasmoses sont aussi des pathologies pulmonaires. L'examen clinique est généralement insuffisant pour les différencier de la forme MAEDI.

◆ Le même risque de confusion existe avec la forme VISNA dont les manifestations nerveuses ne sont pas typiques :

→ la forme paralytique de la "tremblante" (autre maladie virale des petits ruminants), est ainsi pratiquement impossible à distinguer de la maladie VISNA sans examen histologique.

→ la coenurose (ou tournis) peut être difficile à distinguer du VISNA si les vésicules de coenure ont une localisation médullaire : dans ce cas apparaît également une paralysie progressive.

→ de nombreuses maladies bactériennes peuvent aussi avoir des complications nerveuses. C'est le cas de la forme encéphalitique de la listériose : cependant son évolution rapide et d'autres signes cliniques (avortements, diarrhées...) permettent de faire la distinction assez facilement.

VI. 2 . Diagnostic virologique :

L'analyse microbiologique classique permet d'évaluer la part de responsabilité revenant aux parasites et/ou aux micro-organismes dans la survenue des symptômes pulmonaires ou nerveux.

Quant à l'isolement du virus à partir d'un organe de mouton malade, il s'agit d'une procédure longue. Il est donc préférable de recourir aux tests sérologiques, rapides et relativement fiables.

VI. 3 . Diagnostic sérologique :

Trois tests sont généralement utilisés :

- le test d'immunodiffusion sur gélose (IDG),
- le test ELISA,
- et plus rarement le test d'immunofluorescence indirecte.

Le test ELISA est plus spécifique et plus sensible. Les nouveaux kits mis au point permettent de limiter le nombre de résultats équivoques et donc le nombre de tests de confirmation nécessaires (197).

Cependant le faible coût de la technique IDG, associé à sa simplicité d'exécution en fait un test de choix dans la plupart des laboratoires vétérinaires. Le principe est basé sur un phénomène de diffusion en gélose, puis sur la réaction de précipitation entre l'antigène et l'anticorps provenant du sérum à tester.

VI. 4 . Diagnostic histologique :

C'est au cours d'examens histologiques que la différence essentielle entre la maladie MAEDI et l'adénomatose pulmonaire peut être mise en évidence. Les lésions microscopiques induites par le MAEDI sont caractéristiques d'une pneumonie interstitielle avec hyperplasie lymphoïde. La formation adénomateuse résulte, quant à elle, d'une hypertrophie de l'épithélium des bronches et des alvéoles : à la lecture des coupes, on a l'image d'un adénocarcinome (164).

Ce type de diagnostic permet également de différencier la forme VISNA de la "tremblante". En effet, le type des lésions et leur répartition dans le système nerveux central sont totalement différents : il s'agit pour la "tremblante" de lésions de dégénérescence, sans phénomène inflammatoire.

VII - TRAITEMENT :

Il n'existe pour le moment aucun traitement spécifique de la maladie même si de nombreuses molécules sont testées sur ce lentivirus.

Une étude menée tout d'abord *in vitro* à partir de cellules de plexus choroïdes de mouton infectées par le virus VISNA, a ainsi récemment démontré la capacité de la PME A ou [9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine] à inhiber la répllication du virus. Ce résultat a été confirmé *in vivo* chez les agneaux infectés expérimentalement et traités pendant six semaines : en effet, l'isolement du virus s'est avéré plus difficile, le nombre de cellules mononucléées dans le liquide céphalo-rachidien moins important, et l'examen histologique n'a pas mis en évidence de lésions inflammatoires sévères. De plus, le traitement n'a occasionné aucun effet secondaire significatif (183).

Cependant, si les dérivés nucléosidiques font, à l'heure actuelle, l'objet de recherches intensives et si leur activité antirétrovirale potentielle est testée sur les lentivirus animaux (et notamment sur le virus VISNA-MAEDI), c'est avant tout en vue d'une application au traitement de l'immunodéficience humaine induite par le VIH.

VIII - PROPHYLAXIE :

La prophylaxie médicale est pour l'instant inexistante. Les tentatives de vaccination menées jusqu'ici ont échoué. Le virus, inactivé par la chaleur, le formol ou l'éthanolamine, additionné ou non d'un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium, et inoculé à des moutons, induit ainsi la formation d'anticorps précipitants qui ne protègent pas les animaux (47).

La prophylaxie sanitaire s'avère donc essentielle et c'est dès 1978 que les autorités anglaises ont inclus dans leur règlement d'importation de reproducteurs ovins, une clause relative à la maladie VISNA-MAEDI. En France (58), la maladie n'étant pas légalement reconnue contagieuse, la prophylaxie sanitaire résulte d'une démarche volontaire de la part des éleveurs, et l'application des différentes mesures sanitaires se limite généralement aux troupeaux ovins de sélection (destinés à la reproduction). Ces mesures comprennent, tout d'abord, l'abattage des animaux malades. De plus, le mode de transmission horizontal de la maladie, par voie respiratoire, justifie la séparation des animaux séropositifs de leurs congénères indemnes.

L'isolement des moutons infectés est cependant difficilement réalisable : il implique une vigilance accrue de la part des éleveurs ainsi qu'un bâtiment adapté : pour les petits exploitants, la solution la plus simple et la moins onéreuse est souvent l'abattage pour la boucherie des quelques animaux infectés ne présentant pas encore les signes cliniques de la maladie. L'action prophylactique la plus facile à mettre en oeuvre et permettant, de plus, de réduire de façon significative l'incidence de l'infection au sein du cheptel, consiste à séparer les agneaux de leur mère dès la naissance, avant léchage et allaitement (199). L'élevage "artificiel" permet ainsi d'éviter la transmission verticale du virus par le colostrum ou le lait.

DEUXIEME PARTIE

**RAPPELS SUR LE VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE
ET
STRATEGIE ANTIRETROVIRALE**

I - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) :

I.1. Découverte du virus : (15, 98, 131, 132)

En **juin 1981**, le Center for Disease Control (CDC, centre de contrôle des maladies) d'Atlanta aux U.S.A. décrivait une série de cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* chez de jeunes homosexuels de San Francisco. Ces pathologies semblaient étroitement liées à un état d'immunodépression des patients qui se trouvaient la proie d'infections multiples (candidose buccale, rétinite à cytomégalovirus, herpès chronique...). Plusieurs cas de sarcomes de Kaposi, affection très rare jusqu'alors, étaient également recensés dans la population homosexuelle de Los Angeles, San Francisco et New York. Ces pathologies furent alors décrites comme les **manifestations du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)**.

Peu après 1981, des cas semblables n'ont pas tardé à être signalés dans d'autres pays du monde, touchant également des toxicomanes consommateurs de produits injectables, des hémophiles recevant des facteurs de la coagulation, les partenaires sexuels de personnes appartenant à ces groupes ainsi que les enfants nés de mères infectées. Les études épidémiologiques montrèrent clairement alors que le SIDA était une **maladie infectieuse, probablement virale, et transmissible par voie sexuelle et sanguine**.

Plusieurs virus rencontrés chez les personnes immunodéprimées, tels que le cytomégalovirus, le virus de l'herpès, le virus de l'hépatite B, le virus d'Epstein-Barr, furent initialement impliqués dans l'étiologie du SIDA. L'hypothèse du HTLV (Human T Leukemia Virus), basée sur des données séroépidémiologiques et après isolement du virus chez un malade du SIDA, mit les américains ESSEX et GALLO sur une mauvaise piste. La corrélation entre HTLV et SIDA est peu probante : aucun cas de SIDA n'a été décrit chez les populations infectées par l'HTLV au Japon, et inversement, l'infection par le HTLV-I est très rare chez les malades européens atteints de SIDA.

Au même moment, en **1983**, l'équipe de MONTAGNIER, envisageant elle aussi que des **rétrovirus** comme l'HTLV pouvaient être impliqués dans cette maladie, considéra que les meilleures chances d'isoler l'agent causal existaient, non pas quand la maladie était très avancée (lorsque les cellules supposées être les cibles du

virus avaient disparu), mais au début, quand seuls existaient des signes précurseurs tels que des adénopathies et quand les cellules T étaient encore nombreuses. Les lymphocytes d'une biopsie d'un ganglion d'un malade homosexuel atteint du syndrome dit des lymphadénopathies furent alors mis en culture et permirent d'isoler un nouveau rétrovirus jusqu'alors inconnu chez l'homme; celui-ci fut appelé **LAV** (Lymphadenopathy associated virus).

En 1984, plusieurs équipes américaines isolèrent des virus similaires ou identiques nommés **LAV**, **HTLV-III** et **ARV** (Aids related virus). L'association causale avec le SIDA fut également démontrée. Ce n'est qu'en 1986 qu'ils furent regroupés sous un même nom par la communauté scientifique internationale: **virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**.

La mise en évidence de sérologies VIH atypiques chez des habitants de Guinée Bissau et d'autres pays d'Afrique de l'Ouest fit soupçonner l'existence d'un second virus du SIDA. Dans un premier temps, furent rapportés des cas de personnes asymptomatiques présentant des anticorps contre les protéines de capsid du VIH, mais sans anticorps détectables contre les protéines d'enveloppe. Indépendamment, des cas de SIDA furent observés dans la même région chez des personnes à sérologie VIH atypiques ou négatives. Un rétrovirus morphologiquement semblable au VIH, et partageant le même tropisme pour les cellules CD4+, fut isolé de ces patients en 1986 par MONTAGNIER. Ce nouveau virus présentant un sérotype distinct fut nommé **VIH-2** tandis que le prototype du virus du SIDA fut rebaptisé **VIH-1**.

1.2. Diversité des souches de VIH : (29, 93)

Comme nous venons de l'évoquer, deux virus ont été identifiés chez l'homme, le **VIH-1** et le **VIH-2**. Le code génétique du VIH-1 est trop éloigné de celui du VIH-2 pour penser qu'il en dérive par simple mutation. Outre les variations génétiques, ils se caractérisent par une répartition géographique différente ; alors que le VIH-1 se rencontre dans toutes les régions du monde, le VIH-2 prédomine en Afrique de l'Ouest et reste confiné à cette région. La transmission du VIH-2 semble également plus difficile ; une fois transmis, il cause moins fréquemment la maladie, et moins rapidement que le VIH-1.

Chez chacun de ces virus, **plusieurs sous-types** ont de plus été caractérisés.

• Parmi les variants de type VIH-1, deux groupes ont été clairement identifiés :

→ **le groupe M** (pour majeur) qui inclut la quasi totalité des variants isolés de par le monde et qui est lui-même subdivisé en 9 sous-types de A à I. Le sous-type B correspond aux isolats provenant des pays industrialisés (Amérique du Nord, Europe, Australie, Japon). Une très grande hétérogénéité (sous-types A,C,D,E,G et H) est constatée en Afrique, tandis que certains foyers épidémiques récents montrent une homogénéité importante des isolats (sous-types F au Brésil et en Roumanie, G en Russie, C en Inde, B et E en Thaïlande).

→ **le groupe O** (pour outlier ou outgroup) rassemble un nombre limité de variants très éloignés de ceux du groupe M et isolés quasi-exclusivement chez des patients originaires de régions d'Afrique centrale, particulièrement du Cameroun.

• Bien que beaucoup plus limité que le VIH-1 dans sa diffusion mondiale, le VIH-2 peut être également classé en différents sous-types (de A à E).

Cette grande diversité des souches est le témoin d'une variabilité génétique importante des rétrovirus impliqués dans le SIDA, que nous développerons par la suite.

I. 3. Virologie :

I. 3. 1. Dimension et morphologie :

Comme les autres lentivirus, les VIH sont des virus enveloppés sphériques d'environ 110 nm de diamètre. Le génome est contenu dans une capsidie protéique. Celle-ci est entourée d'une enveloppe dérivée de la membrane de la cellule hôte et portant à sa surface des spicules glycoprotéiques (36,188) (figure 11). Deux sortes de particules virales peuvent être mises en évidence : d'une part les particules immatures avec une couche dense d'environ 25 nm le long de la membrane du virion et présentant un centre clair, d'autre part les particules matures montrant une partie centrale dense aux électrons (83, 139). Il a été mis en évidence qu'une morphologie « mature » du VIH-1 semble essentielle au pouvoir infectieux et serait notamment indispensable à l'achèvement

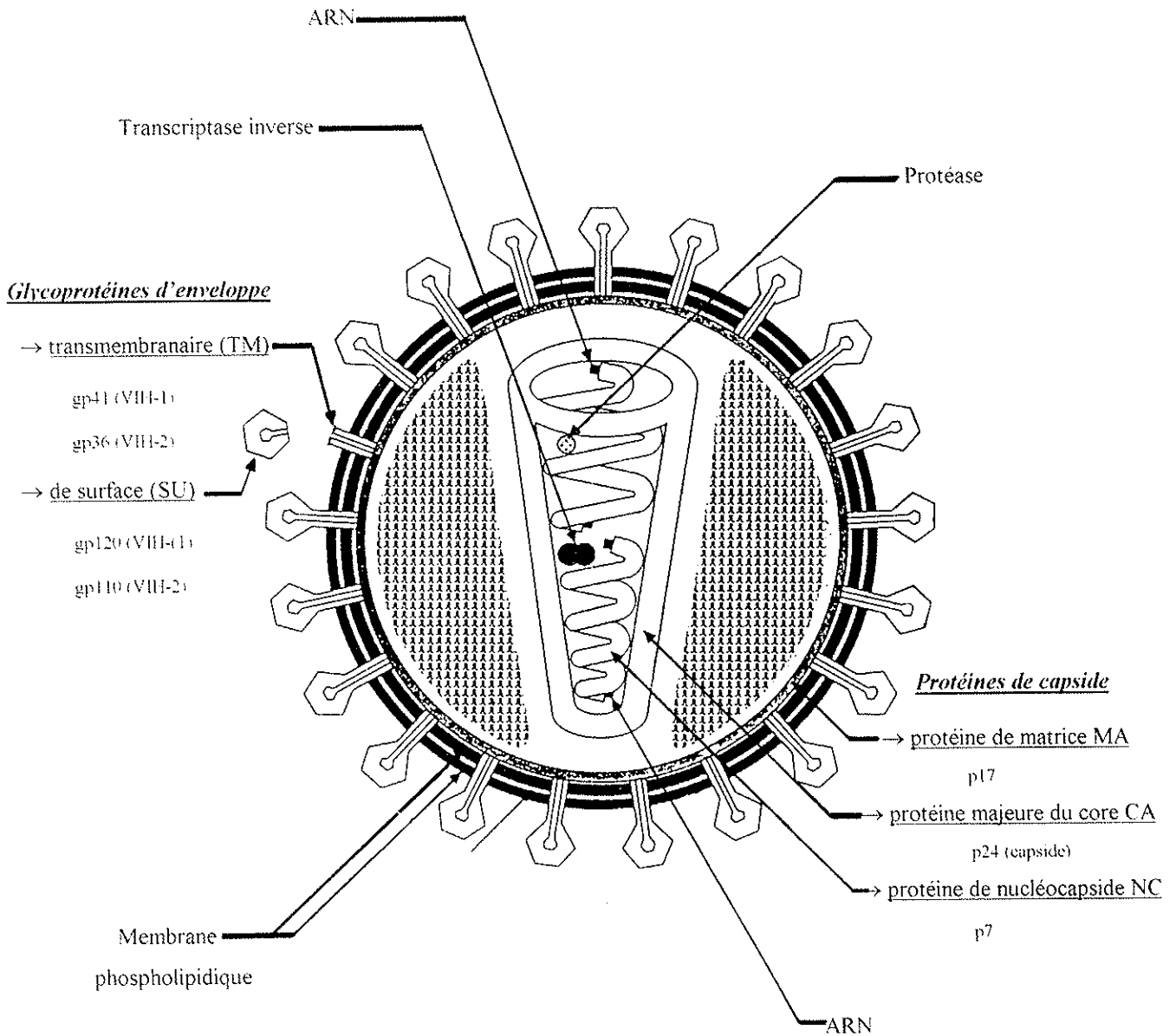


Figure 11 : représentation schématique du VIH (15)

des étapes initiales précédant l'intégration (155). La seule différence observée dans la morphologie des virus VISNA-MAEDI et VIH est l'aspect du core central : on observe une nucléocapside pléomorphe chez les virus VISNA-MAEDI matures alors que celle des VIH apparaît de forme conique, s'étalant sur la totalité du diamètre du virion, avec une partie large libre de 40 à 60 nm et une zone resserrée d'environ 20 nm reliée à l'enveloppe (139).

I. 3. 2. Organisation génomique : (figure 12)

En commun avec les autres rétrovirus, les VIH renferment leurs informations génétiques dans une molécule d'ARN monocaténaire. Chaque virion contient deux de ces molécules longues de 9 à 10 kilobases.

De même que chez le virus VISNA-MAEDI, on retrouve dans le génome :

- ⇒ des **séquences répétitives LTR** aux extrémités 5' et 3'.
- ⇒ trois **gènes de structure** caractéristiques des rétrovirus (**gag, pol** et **env**),
- ⇒ et trois petits **gènes de régulation** (**vif, tat** et **rev**).

En plus de ces six gènes, le génome des VIH s'enrichit de **quatre petits gènes supplémentaires** également impliqués dans les processus de régulation :

⇒ le **gène nef** (negative regulator factor) : il est caractéristique des lentivirus de primates (VIH, SIV). Il s'exprime au cours des étapes initiales de la réplication virale à partir d'un transcript multiépissé (105, 106), et code pour une protéine myristylée de 27 à 30 kDa localisée essentiellement dans le cytoplasme des cellules infectées, et associée aux lipides membranaires. On la retrouvera également dans le noyau (86, 104, 107). La protéine Nef n'est pas retrouvée dans les particules virales.

Sa fonction précise n'est pas connue ; bien qu'initialement considérée comme un inhibiteur de la réplication virale, des études récentes ont pourtant montré un effet positif sur le taux de réplication des virus. Elle agit par deux mécanismes indépendants : d'une part elle va stimuler l'intériorisation des protéines de surface CD4, leur accumulation dans des endosomes, et leur dégradation ; d'autre part, elle va faciliter la réplication et augmenter l'infectivité des particules virales (31, 37, 94, 166, 168).

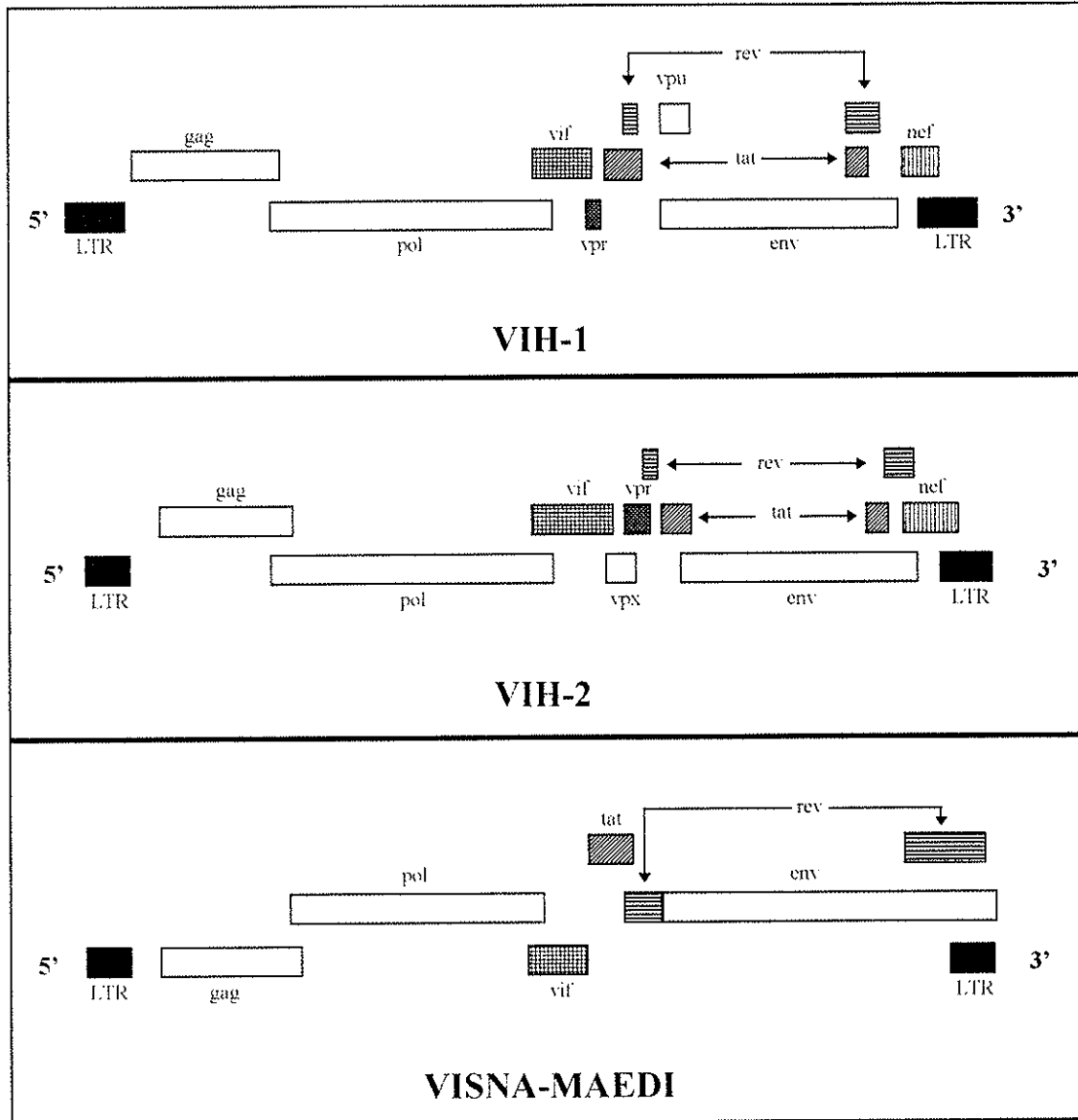


Figure 12 : organisation génomique des virus VIH-1, VIH-2, et VISNA-MAEDI (76, 128).

Des expériences menées sur des singes Rhésus infectés par le SIV ont montré que l'expression de la protéine Nef est nécessaire au maintien d'une charge virale élevée et à l'induction du stade SIDA. D'autres études menées sur des souris humanisées SCID ont montré son importance dans la réplication et la pathogénicité (97).

⇒ le **gène vpr** (viral protein R) (57) : il code pour une protéine de 96 acides aminés que l'on retrouve dans le noyau des cellules infectées, et qui sera également intégrée dans les nouveaux virions lors de l'assemblage. Ce gène accessoire, bien qu'il ne soit pas indispensable à la réplication virale dans des lignées de cellules T et dans les cellules mononucléées du sang périphérique primaires activées (cellules se divisant), est cependant nécessaire à une réplication efficace dans des cellules ne se divisant pas (lignées primaires monocytes-macrophages).

La protéine Vpr va jouer un double rôle dans la réplication virale : peu après l'entrée du virus dans la cellule infectée, et en association avec la protéine de matrice Gag, elle permet l'importation du génome viral dans le noyau des cellules ne se divisant pas ; de plus, elle va bloquer la division cellulaire en phase G₂.

Le rôle pathogène de Vpr dans le SIDA n'est pas bien connu, mais d'après des études réalisées sur des macaques infectés par le SIV, il pourrait jouer un rôle sur la vitesse de progression vers la maladie et augmenter la charge virale.

⇒ le **gène vpu** (viral protein U) (25, 37, 167) : il est présent uniquement chez le VIH-1 et code pour une phosphoprotéine de 81 acides aminés retrouvée au niveau membranaire et cytoplasmique. Elle comprend deux domaines structuraux : un domaine hydrophobe N-terminal attachant la protéine à la membrane cellulaire, et un domaine polaire cytoplasmique C-terminal. Celle-ci montre deux fonctions biologiques indépendantes avec une augmentation de la production virale quel que soit le type de cellule infectée et une induction de la dégradation du récepteur viral CD4 dans le réticulum endoplasmique.

Le gène vpu n'est pas retrouvé chez des virus proches (VIH-2, SIV), excepté chez le SIV du chimpanzé (SIV_{cpz}).

⇒ le **gène vpx** (viral protein X) : présent seulement chez le VIH-2, sa fonction n'est pas connue. Il code pour une protéine d'environ 16 kDa qui agirait à un stade précoce de la réplication du virus.

Les produits des différents gènes, leur localisation et leurs fonctions sont regroupées dans le tableau 2.

| GENES | PRODUITS DES GENES | LOCALISATION | FONCTIONS |
|------------|---|---------------------------|---|
| gag | Gag { p17 = MA p24 = CA p7 = NC p6 | cytoplasme virions | Protéines de structure interne |
| pol | Pol { p10 = PR p66-51 = RT p31 = IN | cytoplasme virions | Activités enzymatiques (transcriptase inverse, intégrase, protéase) |
| env | Env { gp120 + gp41 (HIV-1) gp110 + gp36 (HIV-2) | cytoplasme virions | Glycoprotéines d'enveloppe → fixation, fusion membranaire → régulation négative de l'expression des CD4 |
| vif | Vif = p23 | cytoplasme virions | variables selon le type de cellule action tardive dans le cycle de réplication → augmentation du pouvoir infectieux → action modulatrice positive de l'infection lentivirale |
| tat | Tat = p14 | noyau | → Régulation positive : transactivation de l'expression virale |
| rev | Rev = p20 | cytoplasme ↕ noyau | → régulation positive de l'expression des protéines de structure (transport des ARNm non épissés et 1-épissés du noyau vers le cytoplasme) → régulation négative des gènes de régulation |
| nef | Nef = p27-30 | cytoplasme +++ noyau + | → augmentation de l'infectivité des particules virales produites par les cellules infectées → régulation négative de l'expression des CD4 |
| vpr | Vpr = p15 | noyau virions | → assemblage des constituants viraux → transport du génome viral vers le noyau → blocage de la division cellulaire |
| vpu | Vpu = p16 | cytoplasme | → augmentation de la production virale → régulation négative de l'expression des CD4 |
| vpx | Vpx = p16 | noyau virions | ? |

Tableau 2 : produits, localisation et fonctions des gènes du VIH.

1.3.3. Tropisme cellulaire :

Les **cellules cibles** du VIH sont caractérisées par la présence à leur surface d'une molécule réceptrice, la protéine CD4, sur laquelle vient se fixer le virus par l'intermédiaire de sa glycoprotéine de surface. Elles sont multiples et comprennent (55) :

- les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ ou lymphocytes T helper.
- les cellules de la lignée monocytes-macrophages (monocytes circulants, cellules microgliales cérébrales, cellules de Küpfer hépatiques et macrophages de tous les tissus).
- les cellules folliculaires dendritiques présentes dans les ganglions.
- les cellules originaires des précurseurs médullaires, distinctes de la lignée macrophagique (cellules interdigitées de thymus, de rate, de ganglions, cellules de Langerhans épidermiques).

D'autres cellules n'exprimant pas la protéine CD4 à leur surface peuvent être infectées par le virus (démontré lors d'expériences *in vitro* avec des fibroblastes humains). Ceci explique en particulier la présence de virus au niveau de certaines cellules cérébrales et du tube digestif.

La chute du taux des lymphocytes CD4⁺ dans le sang périphérique observée au cours de la maladie à VIH a mis en avant l'importance de ces cellules comme cible principale du virus. Mais il semblerait qu'elle soit la conséquence de l'altération d'une structure dans laquelle l'infection virale est cliniquement et histologiquement significative, les ganglions lymphatiques (177). On trouve en effet, chez des patients à un stade précoce ou intermédiaire de l'infection, 5 à 10 fois plus de cellules infectées dans les organes lymphoïdes que dans le sang (143). Durant cette période de latence clinique, le tissu lymphoïde, qui représente une zone d'interaction entre trois principaux types cellulaires, est le siège d'une multiplication active du virus. La réplication a lieu au sein des lymphocytes CD4⁺ des centres germinatifs. Les cellules folliculaires dendritiques portent à leur surface un grand nombre de particules virales, et il semble qu'elles séquestrent ainsi le virus pour le transmettre ensuite aux lymphocytes CD4⁺ lors de leur migration à travers le centre germinatif (29). Les macrophages, qui appartiennent à la population cellulaire infectée de manière latente dans les ganglions, ont une durée de vie longue et ne sont pas détruits *in vitro* lorsqu'ils produisent le virus (125). Les ganglions lymphatiques représenteraient donc le site anatomique principal pour l'établissement et la propagation à long terme de l'infection par le VIH (144).

Le tropisme préférentiel du virus pour certains types cellulaires permet de distinguer différentes souches de VIH (12, 38, 80) :

→ les VIH **T-tropiques** qui infectent essentiellement les cellules lymphocytaires T CD4+. Ils sont caractérisés par un fort pouvoir répliatif (virus rapid/high) et sont hautement cytopathogènes *in vitro* : on parle de VIH de **phénotype SI** (« syncytium inducing ») ou souches lymphotropes syncialisantes. Elles sont isolées au moment de la primo-infection et dans les phases tardives de l'infection virale.

→ les VIH **macrophages tropiques** ou **M-tropiques** qui infectent préférentiellement les cellules de la lignée monocytes/macrophages. Ils sont peu répliatifs (virus slow/low) et faiblement cytopathogènes *in vitro* ; il s'agit de VIH de **phénotype NSI** (« non syncytium inducing »). Ils sont isolés, le plus souvent, à la phase d'infection asymptomatique.

→ les VIH à **dualité tropique** qui se réplient aussi bien dans un type cellulaire que dans l'autre et qui présentent le phénotype **SI**.

Des analyses génétiques portant sur le génome du VIH-1 ont montré que la troisième région hypervariable (boucle V3) de la gp120 contient les déterminants majeurs pour les différences de tropisme et la capacité du virus à induire des syncytia (29, 87, 95, 142). Cependant, d'autres domaines situés aussi bien dans la gp120 que dans la gp41 peuvent aussi influencer ces fonctions.

I.3.4. Mécanismes pathogéniques : (15, 121)

Plusieurs phénomènes sont impliqués, faisant intervenir :

* d'une part des **effets directs du virus sur les cellules cibles** ; étant lui-même cytopathogène, il entraîne par des mécanismes complexes une destruction cellulaire proportionnelle à la charge virale. On peut ainsi observer des phénomènes de lyse directe des cellules, d'apoptose, et la formation de syncytia.

* d'autre part **la réponse immunitaire de l'hôte infecté** : il existe une dualité entre une hyperactivation du système immunitaire, qui conduit entre autre à la production de multiples cytokines, à l'activation cellulaire et à la production excessive d'anticorps, et, dans le même temps, l'apparition progressive d'un déficit immunitaire fonctionnel et quantitatif prédominant sur les cellules CD4. La stimulation excessive du système immunitaire a certainement ici un rôle aussi important que sa déficience dans la pathogénie de la maladie.

Ce concept n'est pas sans conséquence sur la stratégie thérapeutique : ainsi, en plus des antirétroviraux classiques, il faudra peut-être envisager d'autres traitements immunomodulateurs, faisant appel à des inhibiteurs de cytokines ou à des interleukines (IL).

1.3.5. Cycle de réplication viral :

Les rétrovirus se reproduisent dans les cellules hôtes en utilisant leur matériel métabolique et génétique, se comportant en parasite absolu. Leur cycle de réplication complexe, dont nous ne connaissons pas encore tous les mécanismes intimes, se subdivise en nombreuses étapes qui vont constituer autant de cibles potentielles d'action des drogues antirétrovirales. Nous ne ferons ici que citer ces différentes étapes qui seront développées, pour une meilleure compréhension, lors de l'étude des différentes cibles des antirétroviraux dans le cycle de réplication viral.

- ¹ ⇨ adsorption,
- ² ⇨ fusion/pénétration,
- ³ ⇨ décapsidation,
- ⁴ ⇨ rétrotranscription,
- ⁵ ⇨ transfert nucléaire,
- ⁶ ⇨ intégration,
- ⁷ ⇨ transcription,
- ⁸ ⇨ traduction,
- ⁹ ⇨ maturation,
- ¹⁰ ⇨ bourgeonnement.

1.3.6. Dynamique de la réplication virale :

L'infection par le VIH est un **processus de dynamique extrêmement rapide et continu**. Environ deux jours vont s'écouler entre l'infection des cellules cibles et leur lyse, ce qui correspond au temps de réplication du virus dans la cellule. Les particules virales plasmatiques produites ont une durée de vie d'environ 48 heures. Chaque jour, chez l'individu infecté, ce sont des milliards de particules virales qui sont fabriquées, à 99% par des cellules CD4⁺ actives et productives (cellules récemment infectées), et 1% par des cellules mémoire à durée de vie longue (figure 13). L'importante vitesse de réplication est à l'origine de 180 nouvelles générations virales par an (14, 89, 118).

L'importance de la réplication dans les lymphocytes CD4⁺ est considérée comme une cause de l'accroissement du dysfonctionnement immunitaire. Le SIDA serait alors la conséquence d'un niveau de réplication élevé et continu du VIH aboutissant à la destruction des lymphocytes CD4 par le virus et par des mécanismes immuns (89).

L'infection latente des cellules non activées et des lignées macrophagiques est encore mal explorée. La durée de vie des cellules résidentes, sanctuaire rétroviral permettant la persistance de l'infection, est méconnue. Une approche curative de l'infection rétrovirale devrait bloquer la réplication virale dans les cellules productrices jusqu'à l'élimination des cellules infectées de façon latente (80).

1.3.7. Variabilité génétique :

L'importance de la réplication virale associée à l'infidélité de la transcriptase inverse (RT) est à la base de la variabilité génétique, et par conséquent de l'émergence de mutants résistants (14).

L'enzyme virale RT introduit environ une erreur de lecture pour 10 000 nucléotides. Il lui arrive en effet de se détacher de sa matrice de rétrotranscription pour réaliser des sauts en avant (délétions), des sauts en arrière (répétitions), ou pour passer d'une matrice à une autre (recombinaisons). Ce dernier phénomène semble particulièrement important chez la plupart des rétrovirus dont le génome est diploïde, et dont le taux de recombinaison génétique est particulièrement élevé.

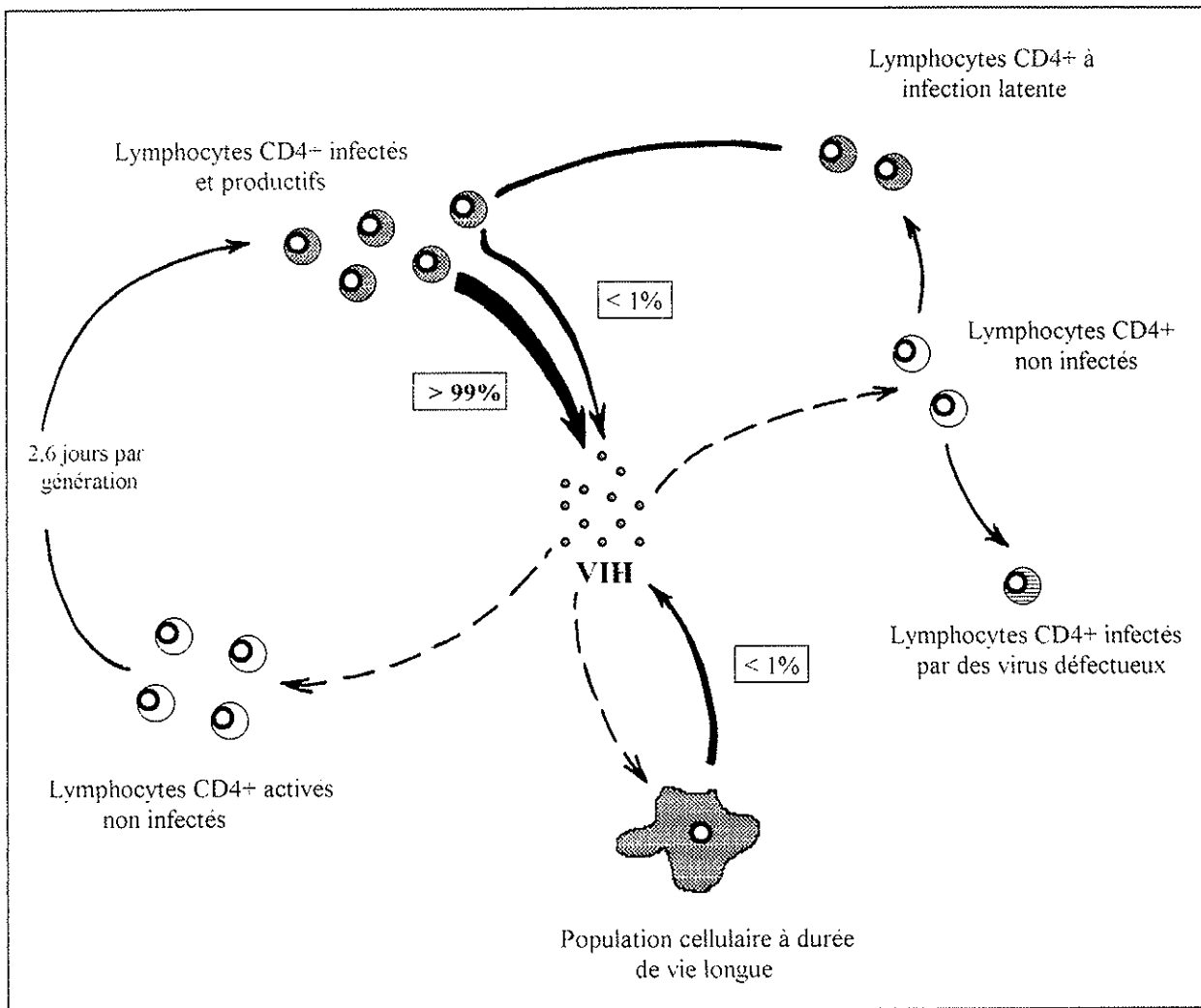


Figure 13 : dynamique de la réplication du VIH *in vivo* (14).

La transcriptase inverse ne disposant pas d'activité enzymatique de correction d'erreurs, et la longueur du génome viral étant d'environ 10 000 nucléotides, on peut considérer que chaque génome est unique. L'organisme est en fait infecté par des populations de virus apparentés ; il peut ainsi exister, d'un virus à l'autre, d'importantes différences au niveau des caractéristiques des protéines de surface qui constituent la cible privilégiée de la réponse immune, au niveau des propriétés biologiques, affectant notamment le tropisme cellulaire, l'effet cytopathogène, la vitesse de réplication et la production de virus infectieux, mais aussi au niveau de la pathogénie (44). Cette variabilité s'exprime par la diversité croissante des sous-types de VIH isolés de par le monde comme nous l'avons précédemment évoqué dans le paragraphe 1.2.

La variabilité est inégale selon la région du génome concernée : le gène le plus variable est le gène *env*, les gènes *gag* et *pol*, quant à eux, sont les régions les mieux conservées. Ainsi, la gp120 contient des domaines bien conservés comme celui de la reconnaissance du récepteur CD4, et des domaines hypervariables comme ceux se trouvant dans la région codant pour l'épitope majeur de neutralisation encore appelé boucle V₃.

La survenue de ces variations est un phénomène constant. Par contre, leur fréquence dans la population répond à des modifications de « l'environnement ». C'est la population la plus performante qui prédomine, on peut alors parler de **sélection naturelle**. La variabilité génétique n'a en fait qu'un seul rôle, celui de **garantir la survie du virus et de sa descendance** (42).

On peut ainsi observer, *in vivo*, une dynamique « évolutive » des phénotypes viraux sous l'effet de la pression de sélection exercée par la réponse immunitaire de l'hôte infecté (39, 177) :

- lors de la primo-infection, l'individu est infecté essentiellement par des virus de phénotype SI, et la charge virale est élevée. Ceci s'explique par l'absence de pression immunologique ; la sélection naturelle favorise les virus à capacité répliquative élevée (rapid/high).

- lors de la séroconversion, c'est-à-dire lorsque l'activité de la réponse immune est à son maximum, et lorsque le sujet ne présente encore aucun symptôme, les virus se multipliant le plus sont détectés et détruits (contre sélection), alors que les virus se multipliant le moins, c'est-à-dire ne présentant pas efficacement leur protéine à l'organisme, survivent. Il s'agit de virus de phénotype NSI à faible pouvoir répliquatif ; on observe à ce moment une diminution de la charge virale.

- au stade SIDA, on assiste à un phénomène d'« épuisement » du système immunitaire qui est la conséquence de la destruction chronique des cellules et de l'architecture des organes lymphatiques. Dans ce cas, il n'y a plus de pression de sélection immunologique, les virus de phénotype SI réapparaissent et la charge virale augmente.

Les implications de cette variabilité génétique vont être extrêmement importantes sur les plans thérapeutiques et diagnostiques, puisqu'elle favorise l'émergence de mutants résistants aux traitements antirétroviraux, rend très difficile la mise au point d'une vaccinothérapie efficace, et peut poser des problèmes de sensibilité et de spécificité des tests de diagnostic.

II - STRATEGIE ANTIRETROVIRALE :

II.1. Méthode d'évaluation des antirétroviraux : (2, 16, 61, 156)

II.1.1. L'étude *in vitro* :

C'est l'étape au cours de laquelle seront évaluées la toxicité et l'efficacité de l'antiviral. De plus, le mécanisme d'action sera étudié. Pour cela, la molécule sera testée sur différents types de cellules (lymphocytes périphériques, monocytes-macrophages, lignées monocytaires...) infectées ou non par des souches de référence de VIH-1 et VIH-2.

Trois paramètres pourront alors être déterminés : - **les concentrations cytotoxiques 50 et 90% (CC50 et CC90)**, c'est-à-dire les concentrations qui vont réduire de 50 et 90% la viabilité des cellules,

- **les concentrations inhibitrices ou efficaces 50 et 90% (CI50 et CI90)**, soit les concentrations qui permettent d'atteindre une protection de 50 et 90% des cellules vis-à-vis du virus,

- **l'indice de sélectivité (IS = CC50/CI50)** qui rend compte de l'efficacité de l'antiviral et permet de juger de l'intérêt de son développement ultérieur. Il doit être au moins égal à 100 pour que celui-ci soit pris en considération.

L'évaluation *in vitro* compte, en plus, l'étude de l'émergence de mutants résistants en cultivant le virus en présence de concentrations croissantes de la molécule testée, l'analyse de l'activité antivirale sur des souches résistant à d'autres composés déjà approuvés, et la recherche d'un effet synergique lors de l'association à d'autres composés.

II.1.2. L'étude *in vivo* chez l'animal :

On distinguera les études préliminaires pharmaco-toxicologiques et les études précliniques.

→ Les premières sont effectuées sur un minimum de deux espèces animales, un rongeur et un non rongeur. Elles permettent d'évaluer la concentration initiale d'antiviral non toxique qui sera testée sur l'homme. Quatre paramètres seront alors analysés : - l'absorption de la molécule après différents modes d'administration,

- sa biodisponibilité,

- sa pharmacocinétique et ses mécanismes d'excrétion,

- sa toxicité sur différentes espèces, en particulier sur des primates.

→ Les secondes permettent de tester les propriétés antivirales sur des modèles animaux (singe infecté par le SIV, chat infecté par le FIV, souris SCID humanisée infectée par le VIH). Leur utilisation est encore assez limitée dans l'évaluation de l'efficacité antivirale des molécules antirétrovirales (28).

II.1.3. L'étude *in vivo* chez l'homme ou essais cliniques :

Elle se déroule classiquement selon quatre phases :

⇒ Essai de **phase I** : il s'agit d'étudier la tolérance et la pharmacocinétique d'une molécule chez l'homme. Il est réalisé par injections de doses croissantes du produit sur des volontaires sains et permet d'estimer la dose maximale tolérée.

⇒ Essai de **phase II** : il correspond à la première administration à des fins thérapeutiques chez des malades au cours d'essais pilotes enrôlant peu de sujets. Il donnera la première indication de l'efficacité et des meilleures conditions d'administration.

⇒ Essai de **phase III** : c'est « l'essai thérapeutique contrôlé ». Cette étape cruciale s'effectue sur un large échantillon de malades et précise l'efficacité et la tolérance dans le cadre d'études comparatives, par rapport aux thérapeutiques considérées comme référence ou à un placebo.

⇒ Essai de **phase IV** : il suit la mise sur le marché du médicament ; il consiste en un contrôle suivi des patients avec des études d'efficacité et de tolérance dans les conditions usuelles de prescription. Il s'agit d'une étape de pharmacovigilance.

Au cours de l'infection par le VIH, compte tenu de l'urgence et de la relative toxicité des agents antirétroviraux, les essais de phase I ont tendance à être conduits sur des volontaires malades et tendent à être remplacés par des essais dits de **phase I/II** évaluant en même temps la pharmacocinétique, la tolérance, la dose utile, et de façon préliminaire l'efficacité, avant les grands essais d'efficacité dits de **phase II/III**.

Ces essais cliniques sont susceptibles de concerner soit une substance nouvelle, soit une substance connue dans de nouvelles indications, soit une association de deux, voire plusieurs médicaments, ou bien même l'étude d'un nouveau schéma thérapeutique.

Depuis le 1^{er} janvier 1991, tout projet d'essai thérapeutique, quelle que soit sa nature, doit être soumis à l'avis d'un comité consultatif de protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales (CCPPRB). Ces comités doivent en particulier vérifier la pertinence du projet, la qualité des investigations, les modalités de recueil du consentement et les intérêts du malade (article L209 du CSP) (156).

II . 2 . Critères d'évaluation de l'efficacité d'un antirétroviral chez

l'homme :

Une fois que l'activité d'un antirétroviral est démontrée *in vitro*, se pose le problème d'évaluer son efficacité *in vivo* à court terme et à long terme (aussi bien lors des essais cliniques qu'en pratique courante) et celui de déterminer les critères qui vont permettre cette évaluation.

Dans le cas de l'infection par le VIH, la méthode de référence repose sur des **critères cliniques**, comme l'évolution du poids, de l'indice de Karnofsky, la survenue d'une infection opportuniste et/ou le passage au stade IV du CDC (maladie constitutionnelle, maladie neurologique, cancer secondaire, ...) (126).

Mais il existe des **critères de substitution** qui sont les critères biologiques. Ils sont de plus en plus utilisés bien que leur interprétation soit incertaine quand il s'agit de comparer des thérapeutiques ou de guider un traitement individuel. Il s'agit essentiellement du suivi du taux des lymphocytes CD4 et d'examen virologiques mesurant la charge virale circulante qui, s'appliquant au sang circulant (lymphocytes infectés et particules virales libres dans le plasma), ne donnent qu'un reflet imparfait de la multiplication permanente dans les tissus lymphoïdes comme les ganglions, et ceci même à un stade précoce de la maladie (61).

La charge virale circulante est appréciée par différents paramètres (29) :

⇒ l'**antigénémie p24** qui mesure l'antigène p24 soluble et intravirionique,

⇒ les **virémies quantitatives cellulaires et plasmatiques** qui déterminent respectivement le nombre de lymphocytes infectés par million de cellules mononucléées circulantes et le nombre de particules virales infectieuses par millilitre (ml) de plasma. Elles sont déterminées par des techniques de culture plutôt longues (15 à 21 jours) mais présentent l'avantage de quantifier les virus infectieux,

⇒ la **quantification de l'ADN proviral** qui mesure le nombre de copies d'ADN proviral intégré par million de cellules mononucléées (lymphocytes et macrophages). Elle évalue l'ADN proviral des cellules infectées de façon latente et des cellules où le virus se réplique,

⇒ la **quantification de l'ARN plasmatique** qui mesure le nombre de copies d'ARN viral par ml de plasma. Elle concerne l'ARN des virions infectieux et des virions défectueux.

C'est la quantification de l'ARN plasmatique, désignée sous le terme de **charge virale (CV)**, qui est de plus en plus fréquemment employée. Elle reflète la quantité de cellules infectées et la vitesse à laquelle elles sont infectées. En pratique, elle est le témoin de l'équilibre entre la production virale et la destruction des lymphocytes CD4 (127).

Actuellement, deux marqueurs biologiques indépendants sont couramment utilisés pour apprécier la réponse à un traitement antirétroviral : le **nombre de CD4** et la **charge virale (CV)**(127).

Certains auteurs considèrent qu'une réponse biologique significative correspond à une chute d'au moins $0,5 \log_{10}$

de la CV dans les trois mois et une augmentation d'au moins 10% du nombre de CD4 à six mois. Pour d'autres, la CV mesure, mieux que le taux de CD4, le risque de progression vers la maladie. Une CV supérieure à 5000 copies par ml représenterait un haut risque de progression, indépendamment du taux de CD4 et de la symptomatologie (127). MELLORS montre que le taux d'ARN viral plasmatique est étroitement corrélé à l'évolution vers la maladie (tableau 3), ce qui suggère une relation dose-effet entre le risque de progression de l'infection à VIH et la CV, mettant l'accent sur l'importance de la rendre indétectable lors d'une thérapeutique antirétrovirale. Mais il reste cependant à étudier la valeur pronostique de cette CV sous traitement, et surtout celle des variations survenant dans une courte période (123, 124).

Comme semblent l'indiquer les résultats de l'étude Concorde, les CD4 apparaissent comme un moins bon marqueur de l'efficacité d'un traitement : l'augmentation des CD4 après une thérapie antirétrovirale ne reflète pas systématiquement un bénéfice clinique (73). Ils restent néanmoins un très bon critère de l'évolutivité de la maladie. Leur mesure est utile comme critère d'inclusion dans des essais, et permet en pratique de suivre l'évolution des patients et de délimiter la prévention des infections opportunistes (54, 63). L'intérêt du maintien des CD4 à un taux supérieur à $500/\text{mm}^3$ n'est plus à démontrer comme en témoignent par exemple les résultats mentionnés dans le tableau 4.

Il faut souligner qu'il existe des variations naturelles de la CV (évaluées à $0,3 \log_{10}$) et du taux des CD4 qui ne reflètent pas simplement des étapes dans la maladie (63, 153, 73). Malgré les données que nous possédons, la place de la CV et du taux de CD4 reste à évaluer plus précisément : c'est l'objectif notamment d'essais en cours (essai ANRS 052 par exemple) (118). D'autres essais, sur le point de se terminer, tentent d'établir une corrélation entre clinique et virologie (ACTG 175, Delta, Nucombo). Ceci donnerait des bases pour comparer deux traitements ou deux stratégies sur des bases virologiques à partir de critères cliniques. Toutefois, la mise en évidence de telles corrélations n'est pas simple car il faut trouver un nombre suffisant d'événements cliniques contemporains de l'effet biologique maximum (61).

Même si nous ne pouvons pas toujours expliquer les variations de ces paramètres et leurs implications dans l'efficacité d'un traitement, ils restent néanmoins de très bons marqueurs indépendants, prédictifs de l'évolution clinique de l'infection à VIH (54, 73, 141, 153). Ainsi, COFFIN compare cette évolution à un train allant à la catastrophe où la CV représenterait la vitesse d'évolution (plus faible sous traitement) et le taux de CD4 la distance du terme (plus grande sous traitement) (figure 14).

| Copies ARN/ml à l'inclusion | Délai moyen de survenue du sida (années) | Probabilité de survenue du sida à 6 ans (%) | Médiane de survie (années) | Probabilité de décès à 6 ans (%) |
|-----------------------------|--|---|----------------------------|----------------------------------|
| ≤ 500 | > 10 | 5,4 | > 10 | 0,9 |
| 501 - 3000 | > 10 | 16,6 | > 10 | 6,3 |
| 3001 - 10 000 | 6,3 | 31,7 | > 10 | 18,1 |
| 10 001 - 30 000 | 5,5 | 55,2 | 7,5 | 34,9 |
| > 30 000 | 2,6 | 60,0 | 4,4 | 69,5 |

Tableau 3 : délai jusqu'au sida et au décès en fonction de la mesure de la charge virale (11).

| Taux des CD4 (/mm ³) | CMV | PCP | Toxoplasmose | Mycobactérie atypique | Tuberculose |
|----------------------------------|-----|-----|--------------|-----------------------|-------------|
| > 350 | 1 | 2 | 1 | 1 | 5 |
| 200 - 350 | 6 | 9 | 4 | 2 | 14 |
| 100 - 200 | 18 | 32 | 19 | 6 | 31 |
| 50 - 100 | 59 | 98 | 60 | 23 | 51 |
| < 50 | 237 | 196 | 142 | 126 | 57 |

Tableau 4 : taux d'incidence (pour 1000 personnes-années) des principales pathologies opportunistes entre 1989 et 1994 (11).

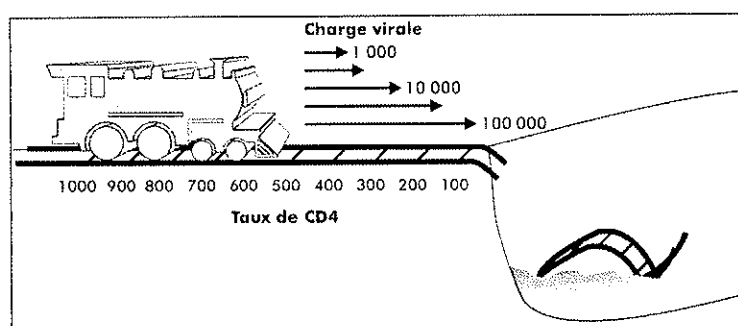


Figure 14 : signification de la charge virale et du taux de CD4 (14).

II. 3 . Médicaments autorisés en pratique clinique : (18)

Un antirétroviral ne peut être utilisé en pratique clinique que s'il dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrable dès lors qu'il a franchi avec succès les phases I, II et III des essais cliniques.

Cependant, depuis août 1994, la panoplie des molécules disponibles s'est étendue avec l'apparition du statut des **autorisations temporaires d'utilisation (ATU)**. Elles permettent, à titre exceptionnel et en dehors du cadre des essais cliniques, l'utilisation de médicaments sans AMM pour le traitement de maladies graves, en situation d'impasse thérapeutique et lorsque les données disponibles sur ce médicament suggèrent un bénéfice réel pour les patients.

Ces ATU, délivrées par l'Agence du Médicament sont de deux types :

→ ATU de cohorte : elles vont concerner des médicaments dont le niveau des connaissances scientifiques est élevé et dont l'AMM est prévisible à court terme.

Ce type d'ATU permet le traitement d'un groupe de patients parfaitement définis et la surveillance des effets secondaires selon un protocole d'utilisation thérapeutique.

→ ATU nominative : elles vont concerner des produits pour lesquels le niveau des connaissances scientifiques est limité. Elles permettent le traitement de patients nommément désignés, à la demande et sous la responsabilité du médecin prescripteur, et avec l'autorisation préalable de l'Agence du Médicament.

C'est en particulier dans l'infection à VIH que ce statut exceptionnel trouve son utilité. Outre les médicaments destinés au traitement des infections opportunistes, c'est surtout par la mise à disposition des nouveaux antirétroviraux que les ATU ont montré leur intérêt.

Mais si les avantages pour les patients sont indéniables, il n'en faut pas moins oublier qu'il s'agit de médicaments innovants ou à risque en terme de santé publique et que cela impose au prescripteur et à l'Agence du Médicament de s'entourer d'un minimum de précautions (suivi médical rigoureux des patients, recherche des effets secondaires, surveillance stricte des conditions d'utilisation, recueil et analyse des données ...).

II. 4 . Cibles des antirétroviraux dans le cycle de réplication viral :

Chaque étape du cycle de réplication des rétrovirus constitue une cible potentielle pour des composés à visée antirétrovirale. Il est intéressant de classer ces composés en fonction de leur point d'impact dans le cycle viral. Notre étude ne constitue pas une liste exhaustive des molécules capables d'inhiber la réplication des rétrovirus : elle se propose simplement de présenter les différents niveaux d'action connus pour des agents antirétroviraux actuels ou futurs, et les mécanismes impliqués dans l'activité antivirale, en s'appuyant sur quelques exemples de molécules représentatives.

Le problème majeur que représente l'infection par le VIH en terme de santé publique explique que nous nous soyons attachés essentiellement aux possibilités de lutte contre ce lentivirus en particulier.

II. 4. 1 . Action au niveau de la fixation du virus :

Les particules virales vont s'amarrer à la surface de la cellule hôte par attachement de leur glycoprotéine d'enveloppe SU (gp120 pour VIH-1, gp110 pour VIH-2, gp135 pour le VISNA-MAEDI) au récepteur cellulaire de surface (CD4 pour les lentivirus de primates). Cette interaction va être à l'origine d'un changement de conformation au niveau des protéines membranaires, nécessaire au déclenchement de l'étape suivante de fusion (26, 154).

Plusieurs solutions ont été envisagées pour **entraver l'interaction gp120-CD4**.

II.4.1.1. Le CD4 recombinant et ses dérivés :

Le CD4 soluble recombinant (**rsCD4**) est une forme soluble de ce récepteur produit par génie génétique dès 1987, et possédant une grande affinité pour la gp120 du VIH-1 (45).

Il va empêcher le virus de se fixer à la paroi cellulaire en jouant le rôle d'un leurre : ainsi, le rsCD4, en saturant la gp120 bloquerait la capacité du virus à se fixer sur les cellules exprimant le récepteur CD4.

Il pourrait également endommager le virus en provoquant l'expulsion de la gp120 (133).

Le rsCD4 possède, *in vitro*, des propriétés inhibitrices vis-à-vis du virus dans les lymphocytes et les macrophages. Il va également réduire la formation des syncytia entre les cellules infectées (gp120+) et les cellules non infectées (CD4+ gp120-). Des études expérimentales menées *in vivo* sur des singes Rhésus ont montré un effet contre l'infection par le SIV (189).

Quant à l'étude chez l'homme, les essais réalisés ont mis en évidence une bonne tolérance, mais malheureusement sans efficacité antirétrovirale.

L'un des inconvénients majeurs de ce rsCD4 est sa demi-vie d'élimination extrêmement courte (environ 1 heure).

Des molécules hybrides contenant la fraction rsCD4 ont alors été développées :

- ainsi, en couplant le **rsCD4** à une chaîne lourde d'**immunoglobuline** (20, 35, 90), on augmente la demi-vie (environ 40 heures), tout en conservant les propriétés antivirales *in vitro*.

De plus, la fixation du CD4 sur une immunoglobuline du groupe G (CD4-IgG) permet à ce complexe de franchir la barrière foeto-placentaire (grâce à l'existence de récepteurs aux IgG du placenta), ce qui présenterait un intérêt tout particulier dans la lutte contre la transmission materno-foetale du virus.

- une autre approche consiste à associer le fragment **rsCD4** à une **toxine cytolitique** (35, 49) ; le CD4 se comporterait alors comme le vecteur d'un composé qui va détruire de façon sélective les cellules infectées par le virus et exprimant à leur surface la gp120.

Ainsi, le rsCD4 a pu être lié à des immunotoxines comme la ricine ou l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, les premiers essais cliniques s'étant heurtés à une toxicité hépatique, l'avenir de cette voie de recherche paraît momentanément limité.

L'approche rsCD4, pour séduisante qu'elle soit par son mode d'action et ses bons résultats *in vitro*, et bien qu'ayant démontré une relative innocuité au cours d'essais de phase I, ne présente que peu ou pas d'effet antiviral chez l'homme (on note en effet une absence de modification des marqueurs immunologiques et virologiques). De plus, ces composés possèdent un pouvoir immunogène et peuvent être à l'origine de la formation d'anticorps dirigés contre le CD4 et/ou contre la fraction greffée. Il existe cependant, *in vitro*, une synergie d'action lors de l'association à des inhibiteurs de la transcriptase inverse (49, 90), qui pourrait être mise à profit dans le cadre de polychimiothérapies visant plusieurs niveaux du cycle de réplication viral.

II.4.1.2. Les composés polyanioniques :

Connus depuis une vingtaine d'années pour leur propriétés inhibitrices de la réplication de nombreux virus (virus respiratoire syncytial, virus influenzae A, SIV, HSV, CMV ...) (91), il n'est pas surprenant de voir tester une quantité importante de dérivés anioniques pour évaluer leur capacité à inhiber le VIH.

Ces composés polyanioniques sont caractérisés par la présence d'une **forte charge négative** qui apparaît nécessaire à l'inhibition du phénomène d'adsorption du virus à la cellule (13).

De très nombreuses molécules ont été étudiées ; elles peuvent être organisées, selon leur structure, en plusieurs classes, avec principalement (50, 99, 129) (figure 15) :

✱ les polysulfates : ils comprennent :

- les polysaccharides sulfatés (sulfates de dextran, de pentosane, de cyclodextrines, d'héparines, ...),
- les polymères sulfatés (PVAS ou polyvinylalcoholsulfate, PAVAS ou polyacrylicvinylalcoholsulfate, PAPS ou polyacétalpolysulfate, ...).

✱ les polysulfonates : ils rassemblent notamment la suramine, les PVS (polyvinylsulfonates), les PSS (polystyrènesulfonates), les PAS (polyanetholesulfonates), les colorants de type « azo acide sulfonique », les dérivés de l'acide naphthalène sulfonique, ...

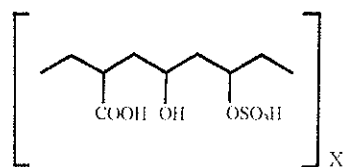
✱ les polycarboxylates : avec entre autres l'acide aurintricarboxylique (ATA) et ses dérivés,

✱ les polyoxométalates,

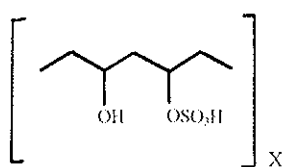
✱ les albumines chargées négativement (NCAs).

La plupart vont exercer leur activité antivirale en occupant les sites chargés positivement de la boucle V3 de la gp120, impliqués dans le processus d'attachement des virus à la cellule (195). C'est le cas des polysulfates et de la majorité des polysulfonates. D'autres seraient susceptibles d'interagir avec le récepteur CD4 (ATA par exemple), ou à la fois avec la gp120 et le CD4 (157).

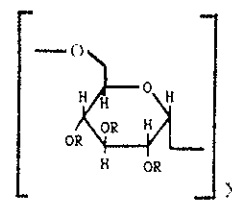
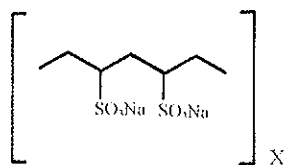
Toutes ces molécules présentent des propriétés antivirales intéressantes *in vitro* et inhibent la formation de syncytia. On note dans certains cas une action inhibitrice de la transcriptase inverse, mais qui ne peut être mise à profit du fait de l'incapacité de ces composés à pénétrer dans les cellules. Cette particularité est la conséquence

Polysulfates :

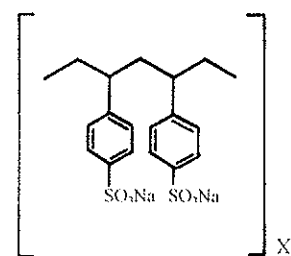
PVAS



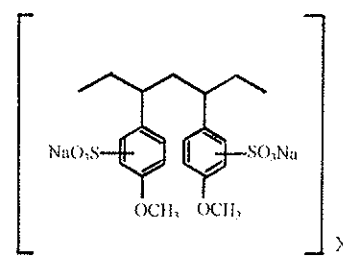
PAVAS

R = SO₃H
sulfate de dextranPolysulfonates :

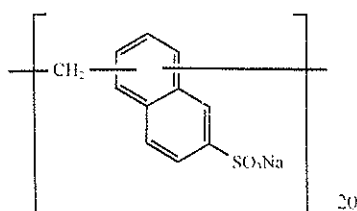
PVS



PSS

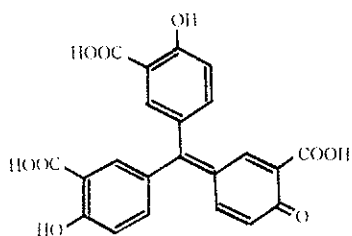


PAS



PRO 2000

20

Polycarboxylates :

ATA monomère

Polyoxométalates :

| | |
|------------------------|------------------------------|
| type Keggin : | $K_6BGaW_{11}O_{39}$ |
| type Dawson : | $K_{12}H_2P_2W_{12}O_{48}$ |
| type Keggin sandwich : | $K_{13}Ce(SiW_{11}O_{39})_2$ |

Figure 15 : structures générales de quelques composés polyanioniques.

de la forte charge ionique, et est également responsable d'une très mauvaise absorption, rendant la voie d'administration intraveineuse indispensable. Enfin, il existe une synergie d'action de la majorité de ces composés avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse (129, 130).

Les rares molécules ayant fait l'objet d'expérimentations chez l'homme se sont avérées décevantes. Ainsi, la suramine fut le premier composé administré aux malades atteints du SIDA. Son utilisation n'a montré aucune efficacité (41).

Le sulfate de dextran fut ensuite testé, se révélant lui aussi inefficace. Il permettra cependant de mettre en évidence, *in vivo*, la très mauvaise biodisponibilité *per os* des composés anioniques, ainsi que l'existence de propriétés anticoagulantes gênantes et l'instabilité des polysaccharides sulfatés (dégradation en métabolites inactifs par clivages glycosidiques et action de sulfatases) (130, 179).

Actuellement, les recherches s'orientent plutôt vers l'étude des polymères sulfonés (plus stables car insensibles à l'action des sulfatases) avec en particulier un polymère sulfoné du naphthalène, le PRO 2000 (28, 162). Il bloque *in vitro* la liaison gp120-CD4, aussi bien sur les lymphocytes que sur les monocytes-macrophages. Un essai clinique de phase I est en cours.

La voie des composés polyanioniques reste cependant peu encourageante du fait de la nécessité d'une administration par voie intraveineuse et de l'interférence avec l'hémostase.

II.4.1.3. L'immunothérapie :

Les essais d'immunothérapie par vaccins à base de protéines virales gp120 ou gp160 chez des sujets ayant encore une immunité cellulaire convenable (plus de 400 ou 500 CD4/mm³), ou l'administration passive d'anticorps dirigés contre les protéines virales font intervenir, parmi d'autres hypothèses, un blocage de la fixation du virus sur son récepteur cellulaire (60, 196).

L'administration de gp120 ou de gp160 chez l'homme s'est révélée être une approche totalement inefficace selon les études récentes rapportées par ALFANDARI et coll. (3).

Quant à l'immunisation passive, elle montre chez le chimpanzé un effet protecteur vis-à-vis de l'infection expérimentale à VIH-1 (35). Quelques essais ont été entrepris chez des patients au stade d'ARC et de SIDA, en

utilisant des plasmas de donneurs ayant un titre élevé d'anticorps et inactivés par la β -propiolactone ou la chaleur. Ces essais montrent une diminution de l'antigénémie p24 et de la charge virale dans le sang ; les résultats sur l'évaluation des CD4 et la progression clinique sont plus incertains (112). L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-gp120, qui ne vaut que pour un seul type de virus, est difficilement envisageable étant donné l'extrême variabilité génétique du virus, en particulier au niveau de sa glycoprotéine de surface.

II. 4. 2. Action au niveau de l'étape de fusion/pénétration du virus :

Après fixation du virus à la cellule durant le processus d'adsorption, il se produit un changement de conformation au niveau du complexe des glycoprotéines transmembranaires (TM) et de surface (SU) (gp41/gp120 pour le VIH-1). Il conduit à l'exposition du domaine fusogénique N-terminal de la glycoprotéine TM, normalement cachée par la glycoprotéine SU, de telle sorte qu'il génère la fusion du virus avec la cellule.

Tous les lentivirus de primates utilisent la molécule CD4 comme principal récepteur impliqué dans l'attachement du virus à la cellule cible. Il ne permet cependant pas à lui seul la réalisation de la fusion des membranes. L'hypothèse de l'existence de **corécepteurs** fut émise dès 1984, fondée notamment sur l'observation que des cellules n'exprimant que le récepteur CD4 n'étaient pas infectables. Ce n'est que très récemment, en 1996, que furent identifiés le CXCR4 et le CC-CKR-5 (62, 80, 108, 122, 174). Le **CXCR4**, également appelé « **fusine** », LESTR ou encore HUMSTR, serait le corécepteur nécessaire à l'infection des cellules lymphocytaires CD4+ par les souches VIH de type SI. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 46 kDa. Le complexe fusine-CD4-gp120 permettrait à la molécule de gp41 de réaliser la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire avant l'internalisation (134). Le ligand naturel de la fusine a été caractérisé : il s'agit d'une α -chémokine, petite protéine de 8 à 10 kDa (22, 140). Le **CC-CKR-5**, quant à lui, serait le corécepteur des souches VIH de type NSI ; il est le récepteur de trois β -chémokines, RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β (4) (tableau 5).

Différents composés se sont montrés capables d'agir sur le processus de fusion/pénétration du virus. Parmi eux, les **lectines**, qui sont des protéines isolées de plantes diverses, sont capables de se fixer sur des hydrates de carbone de façon très spécifique. L'activité antivirale dépend de la nature de la spécificité pour le sucre (10). Les lectines spécifiques du mannose ont la propriété d'interférer, en se fixant sur des chaînes

glycosidiques de l'enveloppe virale, avec le processus de fusion des VIH-1 et 2 et du SIV. Elles vont également inhiber la formation de syncytia à des concentrations très faibles (111).

Les **dérivés triterpéniques** regroupent des composés hémisynthétiques dérivés d'un triterpène naturel extrait de l'écorce de platane, l'acide bétulinique (figure 16).

Les dérivés bétuliniques sont, *in vitro*, des inhibiteurs puissants et sélectifs de la réplication du VIH-1 mais n'exercent aucune protection vis-à-vis du VIH-2 ou d'autres rétrovirus. Ils réduisent la formation des syncytia. Certaines souches de VIH-1 ne sont pas sensibles à ces composés, ce qui sous-entend qu'ils interfèrent de façon très spécifique avec le processus de fusion. Il semble que la cible de ces molécules soit contenue ou interagisse avec les glycoprotéines gp120/gp41 du VIH-1 (50, 119).

Les **albumines succinylées et aconitylées** dérivent de l'albumine sérique humaine. Elles sont uniquement actives sur le VIH-1 (99).

La **siamycine I**, petit peptide de 21 acides aminés produit par une souche de *Streptomyces*, inhibe la réplication des VIH-1 et 2 et du SIV_{mac} *in vitro*. Cette inhibition semble spécifique des rétrovirus et serait le résultat d'une interaction avec une protéine cible de l'enveloppe virale, interférant avec l'oligomérisation des protéines d'enveloppe, l'association gp120-gp41, et/ou la liaison entre l'enveloppe virale et les protéines de membrane cellulaires nécessaires au phénomène de fusion (114).

Les **substances dérivées de la gp41**, telles que le pentafuside ou T-20, et plus récemment le T1052, sont des inhibiteurs puissants du phénomène de fusion *in vitro*. Ce sont des peptides de synthèse (36 acides aminés pour le T-20) dérivés de la protéine transmembranaire gp41 du VIH-1 : ils sont sans effet sur le VIH-2 (1, 100, 193).

Ces composés semblent posséder une activité élevée et dose-dépendante sur les macrophages humains et dans le modèle de souris SCID. Les études réalisées chez le primate montrent des caractéristiques pharmacocinétiques encourageantes. Des essais cliniques chez l'homme devraient préciser l'intérêt de ces molécules (28).

En ce qui concerne la **voie des corécepteurs**, il a été démontré que l'absence de contamination par le VIH, observée chez un petit nombre de personnes hautement exposées, était liée à des mutations intéressant les gènes responsables de la synthèse de la protéine CC-CKR-5. Une délétion de 32 paires de bases des deux allèles codant ce récepteur assure une haute résistance à l'infection par le VIH-1 (163).

Cela suggère que la protéine CC-CKR-5, ainsi que la fusine, pourraient être des cibles d'intervention thérapeutique particulièrement importantes, en utilisant des molécules susceptibles d'empêcher l'interaction virus/corécepteur (telles que des chémokines modifiées, sans effets biologiques propres, mais conservant leur action antivirale), soit en faisant appel à la thérapie génique dans le but de provoquer des modifications génétiques de ces corécepteurs.

II. 4. 3. Action sur le processus de décapsidation : (50, 51, 130)

Lorsque le virus entre dans la cellule, le génome doit d'abord être « désassemblé » des protéines de capsid. Ce processus est appelé décapsidation. Le génome ainsi mis à nu est prêt pour la rétrotranscription. Un certain nombre de composés connus depuis plusieurs années pour leur propriétés antivirales sont maintenant reconnus comme agissant sur le phénomène de décapsidation (amantadine pour les *Myxovirus influenzae* type A, ou arildone et chalcone pour les picornavirus par exemple).

En ce qui concerne la lutte contre les rétrovirus, peu de molécules ont été proposées. Elles font partie de la classe des **bicyclams**, dont la structure générale est représentée figure 17. Ces derniers comptent parmi les inhibiteurs les plus puissants et sélectifs de la réplication du VIH (CI50 de l'ordre de la nanomole, et IS d'environ 10^5). L'activité est identique sur les virus VIH-1 et VIH-2.

Ces molécules peuvent également inhiber la formation de syncytia, mais à des concentrations beaucoup plus élevées que celles nécessaires à l'activité antivirale. Ceci suggère qu'elles pourraient aussi interférer avec le processus de fusion du virus à la cellule.

Aucun de ces composés n'a cependant trouvé d'application en thérapie antirétrovirale.

| Chémorécepteur | Ligand naturel | Corécepteur pour |
|-----------------|--|---------------------------|
| CCR 5 | <u>β-chémokines</u> : -Rantes -MIP-1α -MIP-1β | souches M-tropiques (NSI) |
| CXCR 4 (fusine) | <u>α-chémokine</u> : SDF1 | souches T-tropiques (SI) |

Tableau 5 : corécepteurs impliqués dans l'entrée du VIH dans les cellules et ligands naturels.

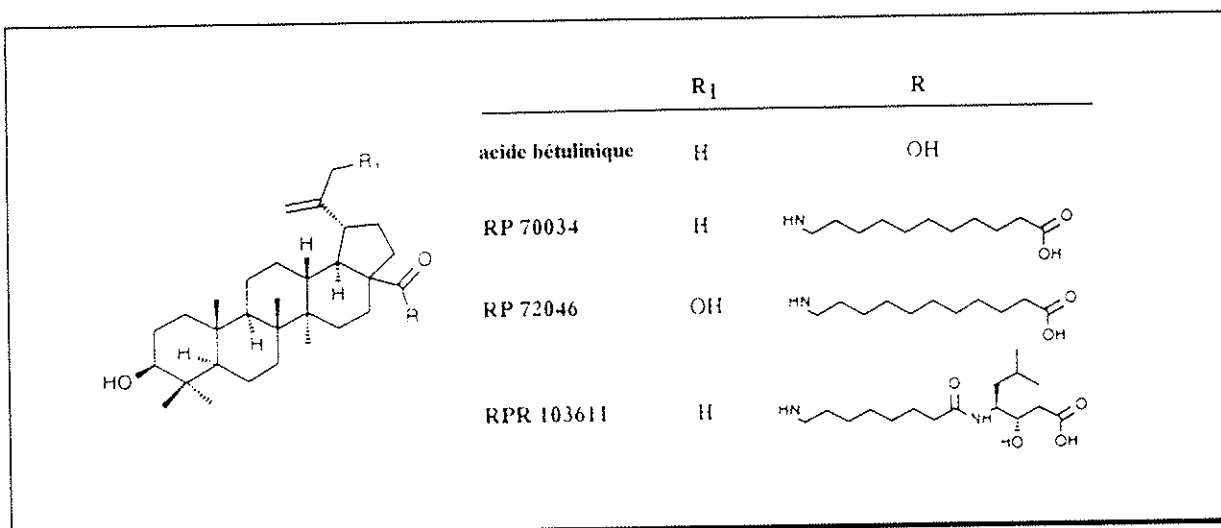


Figure 16 : structures de l'acide bétulinique et de quelques dérivés (119).

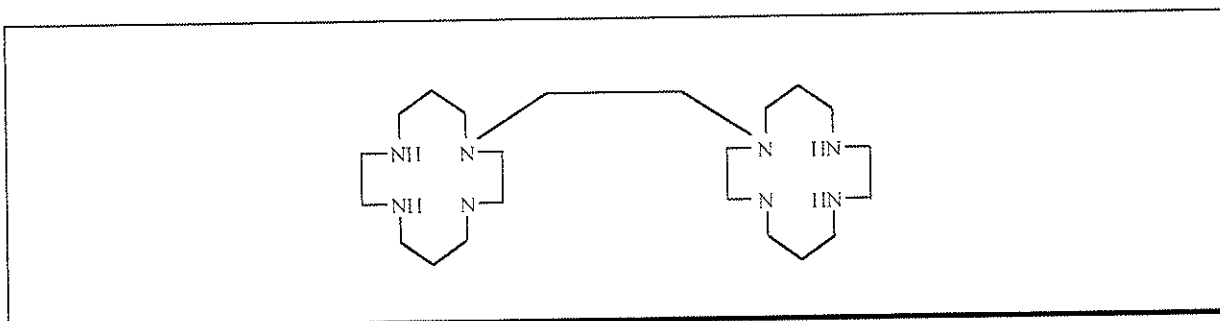


Figure 17 : structure générale des bicyclams (130).

II. 4. 4. Action au niveau de la rétrotranscription :

La plupart des médicaments actuellement disponibles agissent à une phase précoce, c'est-à-dire avant l'intégration de l'ADN proviral dans le noyau : ce sont les inhibiteurs de l'étape de transcription inverse. Au cours de cette étape, l'ARN viral est transformé en un brin d'ADN complémentaire, puis en ADN double brin, par une enzyme spécifique des virus à ARN, la transcriptase inverse. Cette copie du patrimoine génétique s'effectue d'un seul tenant, en répétant les séquences LTR situées aux deux extrémités du génome.

II. 4. 4. 1. Rappels sur l'enzyme de transcription inverse : (28, 102)

La transcriptase inverse est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : une grande sous-unité de 66 kDa (p66) composée de 560 acides aminés, et une petite sous-unité de 51 kDa (p51) contenant les 440 premiers acides aminés de la p66 (figure 18).

Elle possède trois activités enzymatiques distinctes :

- ⤷ une **activité ADN polymérase ARN-dépendante** qui permet la synthèse du brin d'ADN(-) complémentaire à l'ARN génomique,
- ⤷ une **activité ribonucléase H** ou RNAase H, nécessaire à la dégradation de l'ARN,
- ⤷ une **activité ADN polymérase ADN-dépendante** à l'origine de la production du second brin (+) d'ADN.

La structure de la transcriptase inverse a été comparée à une main droite, et peut être divisée en cinq domaines : doigts, paume, pouce, connexion, et poignet (figure 19).

L'activité RNAase H est localisée au niveau du poignet, tandis que l'activité polymérasique se situe au niveau de la paume. Seule la sous-unité p66 contient un site polymérasique actif : la sous-unité p51, outre qu'elle ne contient pas la RNAase H, a une conformation très repliée et compacte, différente de la p66. Le contact entre les deux sous-unités se fait principalement au niveau du domaine de connexion. La liaison entre le pouce de la p51 et le poignet de la p66 serait nécessaire à l'activité ribonucléasique.

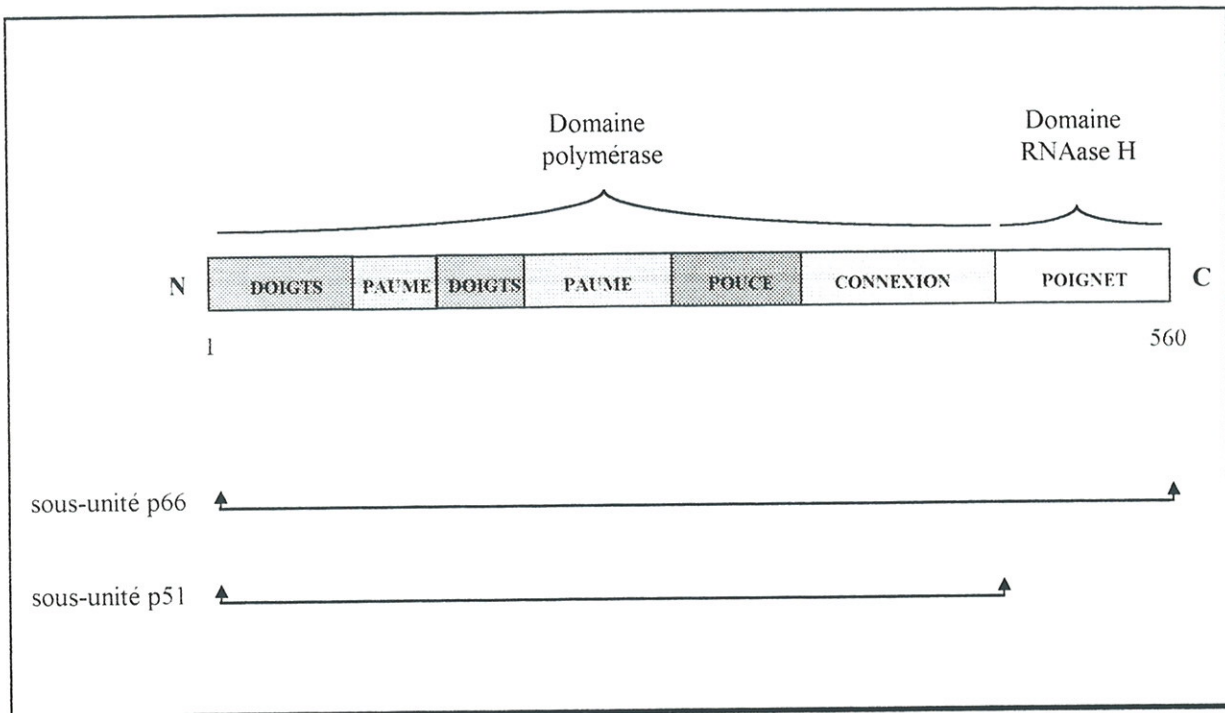


Figure 18 : représentation linéaire de la transcriptase inverse : les séquences comprises dans les sous-unités sont indiquées par les traits horizontaux (102).

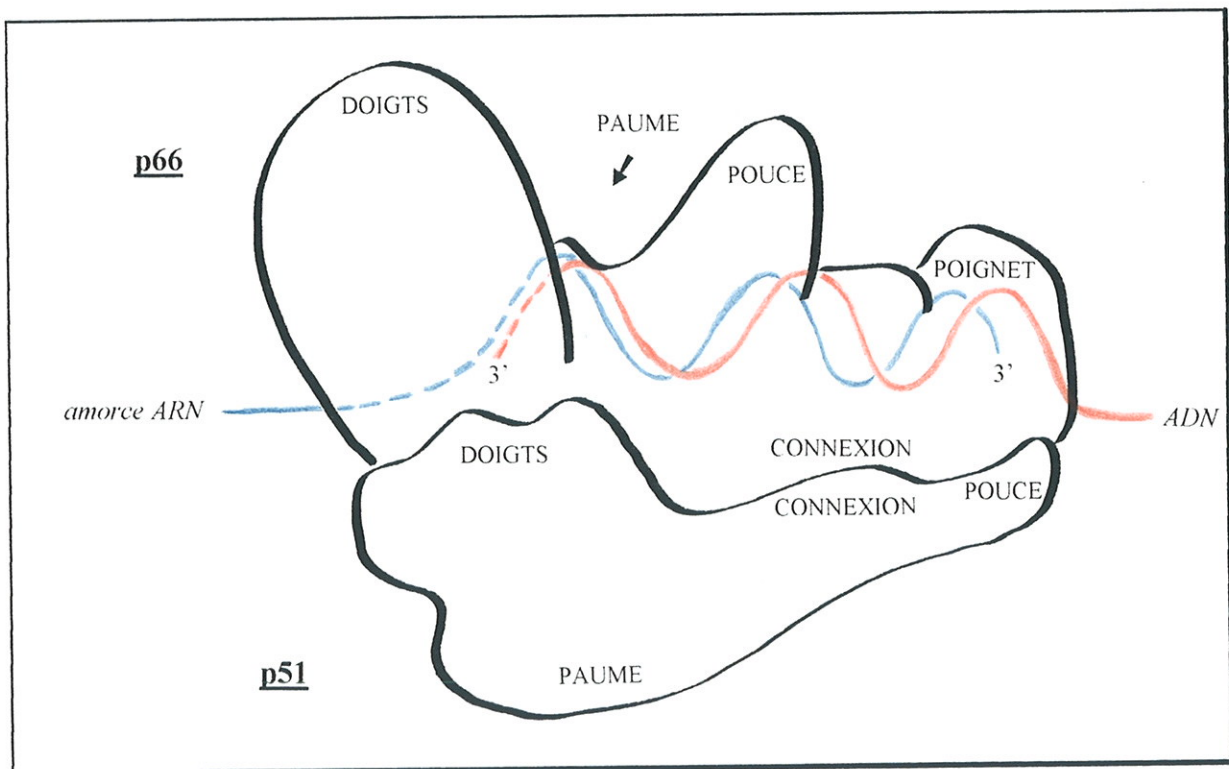


Figure 19 : représentation spatiale de la transcriptase inverse. Entre les doigts et le pouce de la p66 se forme une gorge permettant la fixation de l'ARN qui va être rétrotranscrit en ADN (102).

La synthèse de l'ADN(-) est amorcée au niveau d'un ARNt apparié à une région complémentaire de l'ARN viral (PBS ou primer binding site). Tandis que le domaine polymérasique de la transcriptase inverse procède à l'élongation, le domaine RNAase H dégrade la matrice ARN venant d'être copiée (figure 19). Arrivé à l'extrémité 5' de l'ARN génomique, le complexe enzymatique doit effectuer un « saut » jusqu'à l'extrémité 3' pour poursuivre la synthèse. Cette étape est facilitée par la présence de séquences particulières appelées R au sein des LTR. La synthèse du second brin d'ADN (+) débute alors que celle du brin (-) n'est pas achevée. Elle est amorcée à partir d'un fragment d'ARN viral ayant résisté à la dégradation par la RNAase H.

Ainsi, la transcriptase inverse semble être une cible d'intervention chimiothérapeutique particulièrement intéressante pour deux raisons essentielles : d'une part son rôle dans la réplication du virus et plus particulièrement à une étape précoce, d'autre part sa spécificité, puisque cette enzyme n'existe pas chez l'homme. Cette transcriptase inverse, de par sa plurifonctionnalité catalytique, fournit ainsi plusieurs points d'impact théoriques :

⇒ la RNAase H vis-à-vis de laquelle aucun inhibiteur n'a été découvert jusqu'à ce jour,

⇒ l'ADN polymérase virale : elle constitue encore actuellement la cible moléculaire la plus visée par les thérapies antirétrovirales. Lorsque l'on parle de substances capables d'inhiber la transcriptase inverse, il s'agit en fait exclusivement, jusqu'à présent, de composés interférant avec l'activité polymérasique de cette enzyme.

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse peuvent être regroupés en deux grandes catégories qui diffèrent à la fois par leur structure, leur mécanisme d'action et leur spectre d'activité :

- les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

II. 4. 4. 2. Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse :

Ce sont des composés possédant une **structure** très proche de celle des désoxynucléosides naturels qui servent à construire les chaînes d'ADN (figure 20).

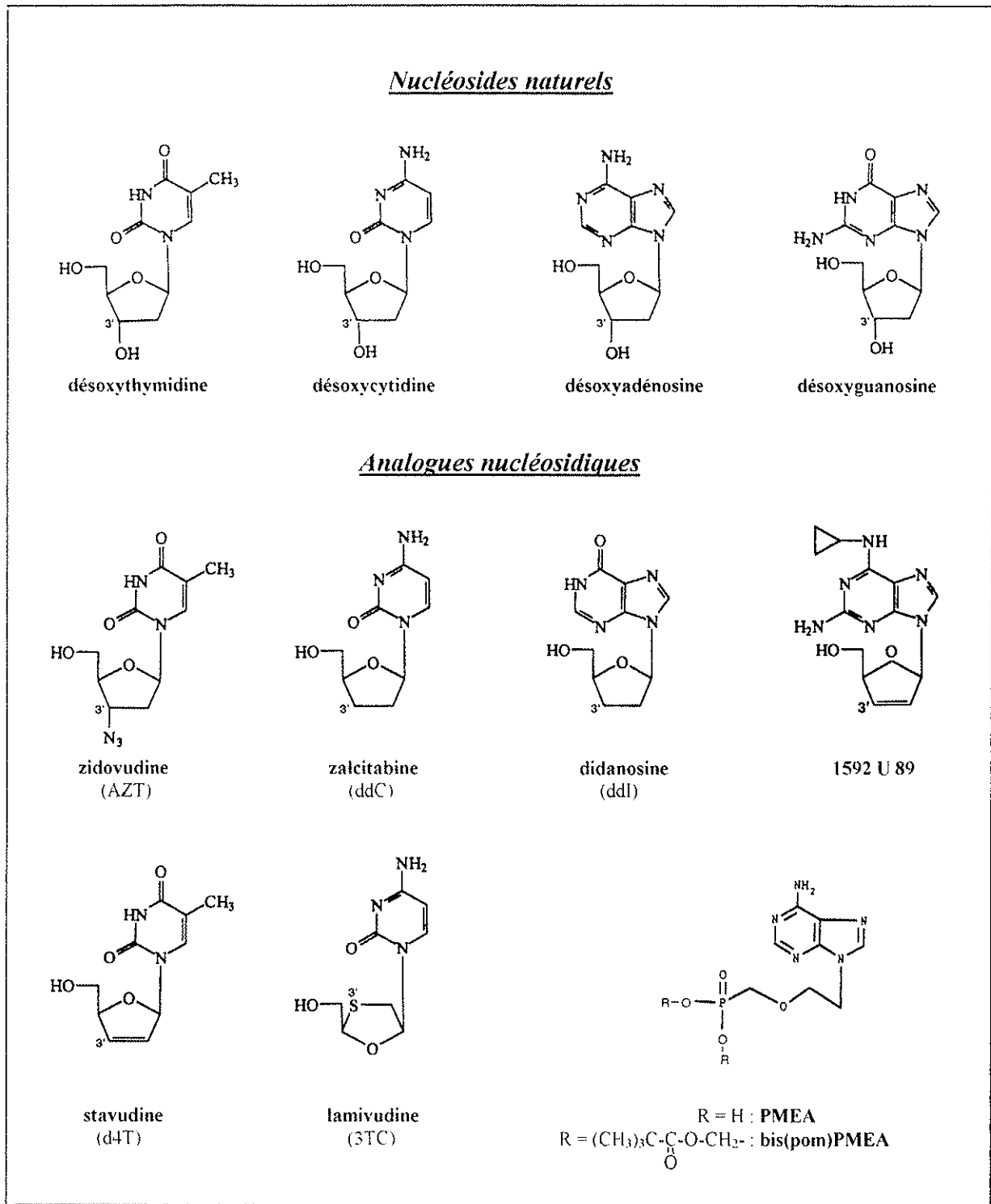


Figure 20 : structures des nucléosides naturels et des analogues nucléosidiques utilisés en thérapeutique (28, 137).

Toutes sortes de modifications de la structure de base peuvent être envisagées, et porter sur le sucre (acyclisation, ajout ou suppression de substituants, insaturation, modification du sucre, ...), sur la base azotée (substitutions diverses), et/ou sur la liaison du sucre à la base.

La recherche sur les analogues nucléosidiques à visée antirétrovirale a bénéficié de celle des inhibiteurs de la synthèse d'ADN dans le cadre du développement d'agents antitumoraux. Ainsi, plus d'une centaine d'analogues nucléosidiques ont été retenus comme actifs par le National Institute of Allergy and Infectious Diseases, dont quelques-uns seulement sont en usage clinique (111) (tableau 6).

Le premier analogue nucléosidique à avoir montré une activité antirétrovirale *in vitro* est la **zidovudine** (AZT) ou 3'-azido-2',3'-didésoxythymidine. Il s'agit d'une molécule ancienne, puisqu'on la connaissait déjà en 1964 pour ses propriétés anticancéreuses, mais fut abandonnée en raison de sa faible activité. Cet analogue dérivé de la thymidine, qui possède une fonction azide en 3' du sucre, présente une activité inhibitrice marquée vis-à-vis de nombreux rétrovirus, aussi bien des lentivirus (VIH-1, VIH-2, SIV), que des oncovirus (MLV, FeLV) (165). L'AZT a obtenu une AMM en 1987 dans le traitement de l'infection à VIH, et demeure depuis le nucléoside de référence.

Il fut suivi par la **ddI** ou didésoxyinosine en 1992. Ce composé, dérivé de l'adénine, a la particularité d'être transformé dans l'organisme, après une première phosphorylation, en ddA (didésoxyadénosine). L'utilisation de la ddA s'est montrée infructueuse du fait d'une néphrotoxicité importante et d'une destruction par l'acidité gastrique (165).

Enfin, la **ddC** et le **3TC**, dérivant de la cytosine, et le **D4T**, analogue insaturé de la thymidine, sont apparus sur le marché en 1994 et 1996.

Un autre analogue, dérivé carbocyclique de la guanosine, le **1592U89**, est actuellement en cours d'évaluation chez l'homme. Son activité antivirale est importante puisqu'en monothérapie, il diminue de 50 à 100 fois le titre de l'ARN viral plasmatique (28).

Tous les didésoxynucléosides (ddN) ont en commun un **mécanisme d'action double** (2, 35, 60, 61, 79) :

⇒ ils vont se fixer sur le site actif de la transcriptase inverse et empêcher la fixation du substrat naturel par **inhibition compétitive** directe de l'enzyme,

⇒ ils vont entraîner un **arrêt de l'élongation** dès lors qu'ils seront incorporés dans le brin

d'ADN naissant. En effet, en l'absence du groupement OH en 3' du sucre de l'analogue intégré dans la chaîne d'ADN, aucun autre nucléotide ne pourra plus s'y attacher, par impossibilité de constituer la liaison phosphodiester entre le 3'OH du premier nucléotide (ici l'analogue de nucléoside) et le 5'OH du nucléotide suivant, quel qu'il soit. On parle de composés terminateurs des chaînes d'ADN. L'ADN transcrit sera alors sous une forme incomplète et non fonctionnelle.

Une autre particularité commune aux ddN est qu'ils sont tous, à la base, inactifs. Ce sont des **prodrogues** qui doivent être phosphorylées en dérivés mono, di, puis triphosphates par des kinases cellulaires, pour pouvoir exercer leur activité sur la transcriptase inverse (figure 21). L'utilisation des dérivés déjà phosphorylés n'est pas envisageable car, n'étant pas capables de pénétrer dans les cellules, ils ne peuvent atteindre le site actif de l'enzyme.

Il existe cependant certaines **spécificités** au sein des analogues nucléosidiques, qui vont résider :

→ dans l'affinité élective de l'analogue triphosphaté pour la cible : l'ADN polymérase virale.

Les composés utilisés en thérapeutique n'ont qu'une faible activité sur les ADN polymérases cellulaires. Les deux familles étant structurellement et fonctionnellement très proches, cette sélectivité provient d'un criblage rigoureux des molécules, mais n'est pas absolue. Plus elle sera faible, plus on s'exposera à des phénomènes de toxicité. En contrepartie, plus elle sera élevée, plus le spectre d'activité risque de s'avérer étroit. L'un des atouts du 3TC, par exemple, serait son peu d'action sur l'ADN polymérase γ mitochondriale et pourrait expliquer sa faible toxicité (136).

→ dans les processus de dégradation : les enzymes de dégradation sont différentes selon les antirétroviraux. La ddi et le D4T sont clivés par des phosphorylases, l'AZT par une réductase, la ddC par une désaminase ... Ces différences auront des conséquences sur l'activité, mais surtout sur la toxicité des dérivés nucléosidiques (161, 176).

→ dans les processus d'activation des analogues antirétroviraux : l'étude de la métabolisation des ddN a montré que leur phosphorylation en dérivés triphosphates est sous la dépendance de l'activation cellulaire pour certaines molécules (AZT, d4T), tandis qu'elle est indépendante du cycle cellulaire pour d'autres (ddI, ddC, 3TC). Les différentes kinases impliquées dans ces transformations sont en effet activées à des degrés divers en fonction du cycle cellulaire : la thymidine kinase indispensable à l'activation de l'AZT et du d4T n'est

efficace que dans les cellules stimulées, alors que les 5' nucléotidases nécessaires à la métabolisation de la ddI, de la ddC et du 3TC fonctionnent dans les cellules activées comme dans les cellules au repos (176).

Les implications de ces spécificités sont importantes et sous-tendent l'intérêt de certaines associations d'antirétroviraux nucléosidiques, susceptibles d'optimiser leur activité par complémentarité et de réduire leur toxicité, au détriment d'autres.

Aux composés précédemment cités, vient s'ajouter une famille de molécules ayant une structure particulière, les **nucléosides acycliques phosphonés** (ANP) (28, 35, 50, 137).

Ils sont caractérisés par l'acyclisation du fragment osidique, et peuvent être considérés comme des ddN monophosphates, de par la présence d'un résidu phosphonate (figure 20). Les charges négatives apportées par cette fonction sont masquées de façon réversible pour permettre à ces composés de pénétrer dans les cellules.

Leur mécanisme d'action reste identique à celui des autres ddN. L'intérêt des ANP réside dans le fait que seules les deux dernières étapes de phosphorylation sont nécessaires à l'activation ; or, c'est la première étape de phosphorylation qui est limitante pour la plupart des nucléosides non phosphorylés.

Ces ANP font partie des inhibiteurs de rétrovirus les plus efficaces. Ils possèdent, de plus, un spectre d'activité très large visant des lentivirus (VIH-1, VIH-2, SIV, FIV, virus VISA-MAEDI), des oncovirus (MSV), des herpesvirus (HSV-1 et 2, VZV, CMV, EBV), ou encore le virus de l'hépatite B.

Enfin, ils présentent un effet antiviral prolongé par rapport aux autres dérivés nucléosidiques, grâce à une demi-vie intracellulaire plus longue.

Récemment, l'un de ces composés est entré en essai clinique, il s'agit du **bis(pom)-PMEA**, promédicament visant à améliorer la biodisponibilité orale du PMEa ou 9-(2-phosphonométhoxyéthyl)adénine.

En conclusion, nous pouvons dire que les analogues nucléosidiques offrent une efficacité globalement comparable, mais limitée et transitoire, surtout en monothérapie, du fait de l'émergence de résistances par sélection de souches virales porteuses de mutations sur le gène de la transcriptase inverse (tableau 7). La toxicité des analogues de nucléosides est une autre limite à leur utilisation. Cependant, les molécules déjà disponibles (tableau 6), qui se différencient par leurs spécificités, possèdent des profils de toxicité et d'activité différents. Elles offrent ainsi la possibilité de modifier les traitements (intolérance, contre-indication, résistance) et d'envisager certaines associations (synergie, complémentarité, réduction des effets toxiques) (185).

| Abréviation | DCI | Nom chimique | Nom commercial | Laboratoire | Forme active | Toxicité | Situation de développement |
|---------------|-------------|--|----------------|----------------------|--------------|--|-----------------------------|
| AZT | Zidovudine | 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine | RETROVIR® | Glaxo-Wellcome | AZT TP | Toxicité hématologique ++ | AMM (1987, révisée en 1995) |
| ddl | Didanosine | 2',3'-dideoxyinosine | VIDEX® | Bristol-Myers Squibb | ddA TP | Toxicité pancréatique ++ Diarrhée Neuropathies périphériques | AMM (1992, révisée en 1996) |
| ddC | Zalcitabine | 2',3'-dideoxycytidine | HIVID® | Roche | ddC TP | Neuropathies périphériques ++ | AMM (1994) |
| d4T | Stavudine | 2',3'-dideoxydéhydrothymidine | ZERIT® | Bristol-Myers Squibb | d4T TP | Neuropathies périphériques ++ | AMM (1996) |
| 3TC | Lamivudine | 2',3'-dideoxythiacytidine | EPIVIR® | Glaxo-Wellcome | 3TC TP | Rare (céphalées, nausées, rashs cutanés) | AMM (1996) |
| 1592U89 | | | | Glaxo-Wellcome | | Nausées, rashs cutanés | Essais phase II/III |
| MKC 442 | | 6-benzyl-1-éthoxyméthyl-5-isopropyluracile | | | | | Essais phase II/III |
| bis(pom)-PMEA | Adéfovir | bis(pivaloyloxyméthyl)-9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine | | | PMEA DP | | |

Tableau 6 : principaux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse mis sur le marché ou en essais cliniques.

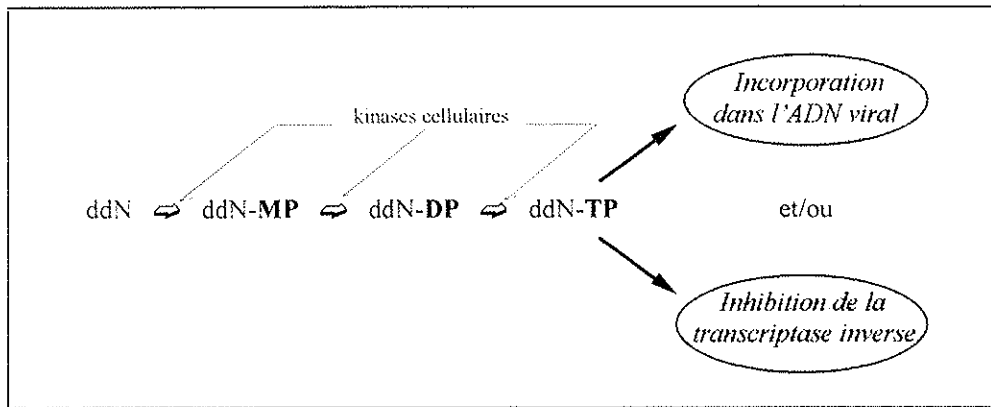


Figure 21 : activation des 2',3' didésoxynucéosides (ddN).
(MP : monophosphate, DP : diphosphate, TP : triphosphate)

| Codons | 41 | 65 | 67 | 69 | 70 | 74 | 75 | 150 | 184 | 210 | 215 | 219 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|---------|-------|-------|
| AZT | M → K | | K → N | | K → R | | | | | L → W ? | T → Y | K → G |
| ddI | | | | | | L → V | V → T* | | M → V | | | → F |
| ddC | | K → N | | T → D | | L → V | V → T* | | M → V | | Y → C | |
| d4T | | | | | | | V → T | I → T* | | | | |
| 3TC | | | | | | | | | M → V | | | |

* : *in vitro* seulement
 C : cystéine ; D : aspartate ; F : phénylalanine ; G : glycine ; I : isoleucine ; K : lysine ; L : leucine ; M : méthionine ;
 N : asparagine ; R : arginine ; T : thréonine ; V : valine ; W : tryptophane ; Y : tyrosine.

Tableau 7 : mutations de la transcriptase inverse induites par les analogues nucléosidiques (185, 61).

II. 4. 4. 3. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs) :

Il s'agit d'un groupe de composés antirétroviraux réunissant des agents structurellement très différents (figure 22). Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes principales (tableau 8) (50, 67) :

- ⇨ les dérivés diazépiniques (TIBO, névirapine, ...).
- ⇨ les dérivés pipéraziniques ou bis(hétéroaryl)pipérazines (BHAPs).
- ⇨ les dérivés α -aminophénylacétamide (α -APA).
- ⇨ les dérivés des pyridinones.
- ⇨ les dérivés des carboxanilides.
- ⇨ les dérivés HEPT ou 1[(2-(hydroxyéthoxy)méthyl)-6-(phénylthio)thymine.
- ⇨ les dérivés TSAO ou [2'.5'-bis-O-(tert-butyldiméthylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-[4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxyde]pyrimidines et purines.

Malgré la diversité des structures, ils possèdent un mécanisme d'action proche, distinct de celui des analogues nucléosidiques, puisque ce sont des **inhibiteurs spécifiques** mais **non compétitifs de la transcriptase inverse**. En effet, ils sont capables de se fixer sur l'enzyme, au niveau d'une poche hydrophobe étroite, située à proximité du site catalytique, entre le pouce et la paume de la sous-unité p66. Cette interaction entraîne un blocage de l'activité enzymatique (35, 175, 185).

Ces inhibiteurs présentent l'avantage, par rapport aux analogues de nucléosides, de ne pas nécessiter de phosphorylation pour être actifs : leur activité est donc indépendante des capacités de phosphorylation intracellulaire.

Leur efficacité *in vitro* est très intéressante, et associée à une faible cytotoxicité (CI50 de l'ordre de la nanomole, et IS supérieur à 10^5). Par contre, le **spectre d'activité est limité exclusivement aux VIH-1** du groupe M, ces drogues n'inhibant pas la répllication des VIH-2, des VIH-1 de groupe O, ni celle d'autres rétrovirus (28, 136). L'activité antirétrovirale des dérivés non nucléosidiques semble confirmée *in vivo* avec, par exemple, une chute profonde de la charge virale plasmatique pour la névirapine ($1,5 \log_{10}$ en 15 jours) (61).

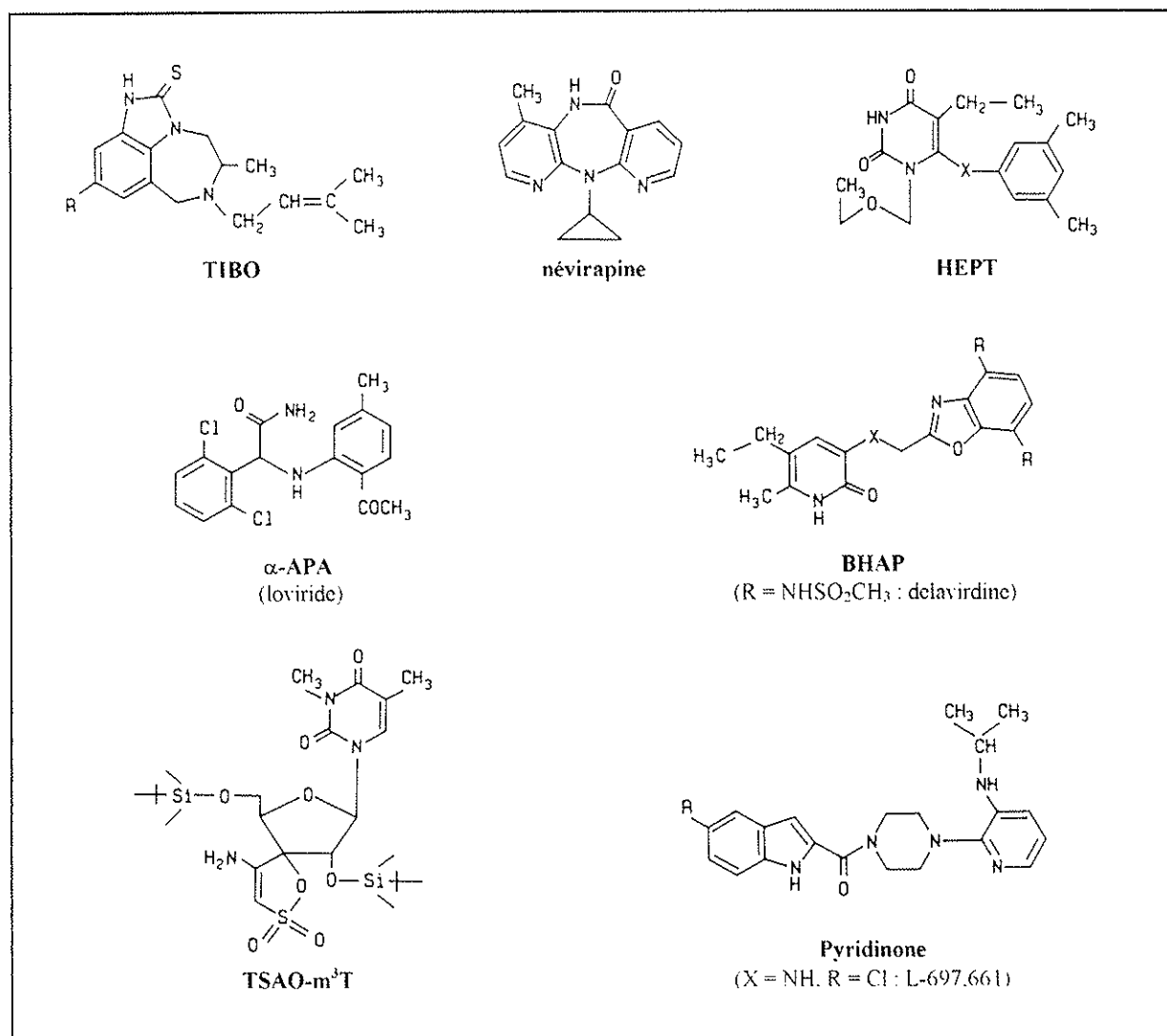


Figure 22 : structures générales des principaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

| DCI | Nom commercial | Laboratoire | Toxicité | Situation de développement |
|---|----------------|----------------------|---|----------------------------|
| DERIVES DES DIAZEPINES | | | | |
| TIBO | | Janssen | rashes cutanés | |
| Névirapine | VIRAMUNE® | Boehringer-Ingelheim | rashes cutanés | ATU |
| DERIVES DES PIPERAZINES (BHAPs) | | | | |
| Délavirdine | RESCRIPTOR® | Upjohn | rashes cutanés | Essais phase III |
| Atéviridine | | Upjohn | rashes cutanés | |
| DERIVES α-AMINOPHENYLACETAMIDE (α-APA) | | | | |
| Loviride | | Janssen | rare | Essais phase II/III |
| DERIVES DES PYRIDINONES | | | | |
| L-697,661 | | Merck | toxicité hépatique faible et réversible | |

Tableau 8 : principales classes d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse et exemples de molécules en développement.

La toxicité, à type de rashes cutanés pour la plupart, est rarement grave avec les dérivés les plus récents, mais oblige à avancer avec prudence dans les essais cliniques.

Malheureusement, ces dérivés sont victimes de **phénomènes de résistances**, apparaissant comme une limitation majeure à leur utilisation en clinique. En effet, ils conduisent, *in vitro* comme *in vivo*, à une sélection très rapide (en quelques semaines seulement) de mutants résistants, responsables d'une perte de l'activité antivirale. Cette résistance d'apparition brutale, contrairement à celle des ddN qui est progressive, atteint d'emblée des niveaux très élevés, avec des CI50 multipliées par 100 voire 1000. Les mutations observées concernent des régions bien définies du gène de la transcriptase inverse (résidus 98 à 106, résidus 180 à 190). Elles entraînent une réduction de la taille de la poche hydrophobe, avec perte de la spécificité de l'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme. De plus, plusieurs d'entre elles sont associées à des résistances croisées pour tous les composés non nucléosidiques de la transcriptase inverse (mutations des codons 103, 180, et 181) (28, 61, 185).

Les NNRTIs ne sont pas balayés pour autant de l'arsenal thérapeutique, car on peut envisager de les administrer en association avec d'autres antirétroviraux. En effet, certaines associations ont mis en évidence un retard dans l'apparition des résistances vis-à-vis des NNRTIs et des mutations du gène pol différentes de celles observées en monothérapie. Leur excellent IS permet également de tenter de les utiliser à des doses bien supérieures à celles nécessaires à l'activité antivirale. Ainsi, avec la névirapine, l'augmentation des doses a permis de limiter le niveau de résistance et de prolonger l'effet sur la charge virale (61).

II. 4. 5 . Action sur le transfert nucléaire de l'ADN viral : (32, 57, 81)

Le transport de l'ADN naissant du cytoplasme vers le noyau s'effectue sous la forme d'un important complexe nucléoprotéique appelé **complexe de préintégration**. Il contient toutes les fonctions virales nécessaires à la synthèse des ADN viraux, à leur transport dans le noyau de la cellule hôte, et à leur intégration dans l'ADN cellulaire. Il est constitué des acides nucléiques du virus et de nombreuses protéines dont l'intégrase, la transcriptase inverse, la protéine de matrice Gag (MA), la protéine régulatrice Vpr.

L'entrée dans le noyau d'un si gros complexe est rendue possible grâce à ses propriétés nucléophiles, et exige de l'ATP, ce qui implique un transport actif. Elle ne nécessite pas de mitose ; en effet, contrairement aux oncovirus pour lesquels la rupture de l'enveloppe nucléaire est indispensable au transport nucléaire du complexe de préintégration, le transport de l'ADN du VIH du cytosol vers le noyau est indépendant du cycle cellulaire.

Deux protéines jouent un rôle prépondérant dans ce phénomène de transfert :

→ la protéine de matrice Gag : à son extrémité N-terminale (acides aminés 18 à 32), il existe **un signal de localisation nucléaire (NLS)** qui facilite le transport du complexe de préintégration dans le noyau. Ce transport, qui fait intervenir la séquence NLS, est un processus **saturable**.

La possibilité de saturer ce mécanisme d'importation par l'utilisation de peptides analogues de la séquence NLS, ou l'emploi de composés visant les motifs NLS des protéines nucléophiles, offrent donc une opportunité d'interrompre de façon sélective la réplication virale dans les cellules ne se divisant pas, comme les macrophages et les cellules microgliales.

La **phosphorylation** au niveau de multiples résidus de la protéine MA est, de plus, essentielle pour permettre sa dissociation de la membrane (masquage de l'effet myristate) et le transport nucléaire du complexe de préintégration. Cette phosphorylation est réalisée, en partie, par une **sérine/thréonine kinase cellulaire**, incorporée dans les virions et associée au complexe nucléoprotéique. *In vitro*, l'inhibition de la phosphorylation de la protéine MA par des inhibiteurs de sérine ou de thréonine kinase a montré une diminution de l'infectivité virale et a empêché le transfert nucléaire du complexe de préintégration, mettant en évidence un nouveau niveau de régulation de l'infectivité du VIH.

→ la protéine régulatrice Vpr : il a été montré que cette protéine nucléophile participait, comme la protéine de matrice Gag, à l'importation du génome viral dans les cellules ne se divisant pas. MA et Vpr semblent cependant jouer un rôle différent et complémentaire, puisqu'elles sont toutes deux nécessaires à ce processus.

Un blocage de l'expression du gène vpr pourrait être envisagé pour inhiber la réplication virale, faisant appel à des techniques de thérapie génique (cf chapitre II.3.11.4.).

Ces nouvelles cibles pour de futurs agents antirétroviraux semblent intéressantes puisqu'elles permettraient d'interrompre l'infection à des étapes initiales du cycle de réplication. Elles ne pourront cependant

être mises à profit que dans la mesure où l'action sur des phénomènes, qui ne sont pas toujours spécifiquement viraux, n'entraîne pas de répercussions néfastes sur des fonctions importantes de l'organisme.

II. 4. 6. Action au niveau de l'intégration :

L'intégration est une étape essentielle dans le cycle de réplication viral, puisqu'il s'ensuit une association stable entre le double brin d'ADN viral et le génome de la cellule hôte. Cet ADN, dit alors proviral, reste sous une forme plus ou moins latente et pourra être exprimé sous l'influence de facteurs encore mal évalués. A ce stade, aucune protéine virale n'est exprimée à la surface de la cellule, il n'y a pas de reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire. De plus, aucun virion n'est produit.

Au cours de cette étape, l'ADN viral est incorporé au hasard au sein du génome de la cellule infectée grâce à des séquences spécifiques situées aux **extrémités des LTR** (9), et grâce à une enzyme virale, l'**intégrase**.

Cette enzyme est codée par l'extrémité C-terminale du gène pol, et est obtenue par clivage protéolytique du précurseur Gag-Pol au cours de la maturation du virion par la protéase. Constituée de 288 acides aminés, elle peut être divisée en trois domaines distincts (65, 102) (figure 23) :

- un domaine N-terminal de 49 acides aminés, comprenant une séquence HHCC en « doigt de zinc » et de fonction inconnue,

- un domaine central, caractérisé par un motif DD(35)E très bien conservé, qui constitue la **région catalytique** de l'enzyme,

- un domaine C-terminal de 66 acides aminés, moins bien conservé, et dont le rôle n'a pas été précisé.

L'intégrase, active sous la forme d'un dimère, est capable de catalyser plusieurs réactions (9, 66, 102, 103) (figure 24) :

★ Tout d'abord, elle va réaliser **l'excision des deux derniers nucléotides** à l'extrémité 3' de chaque brin de l'ADN viral linéaire, laissant le dinucléotide CA-3'-OH en bout de chaîne. Ce processus, appelé clivage ou « préparation de l'extrémité 3' », fait appel à l'**activité endonucléasique** de l'intégrase.

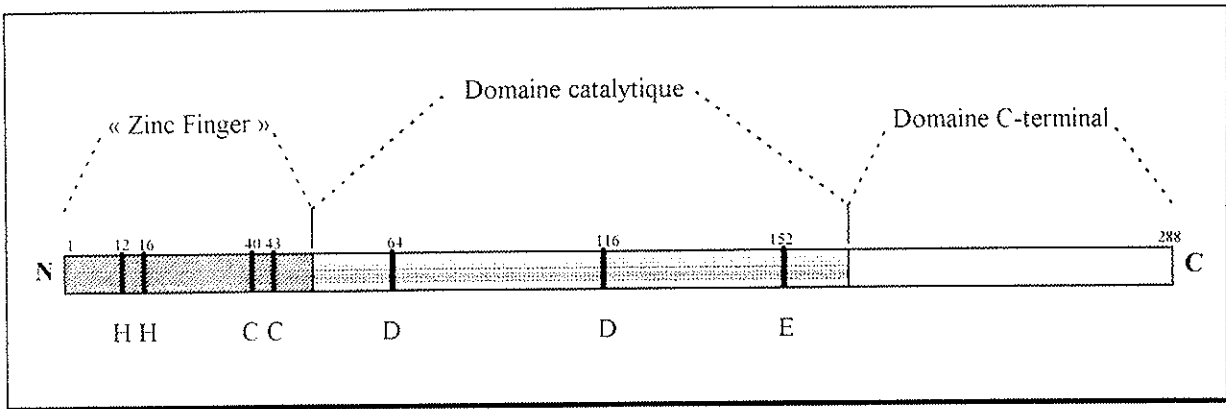


Figure 23 : représentation linéaire de l'intégrase du VIH-1 (102).

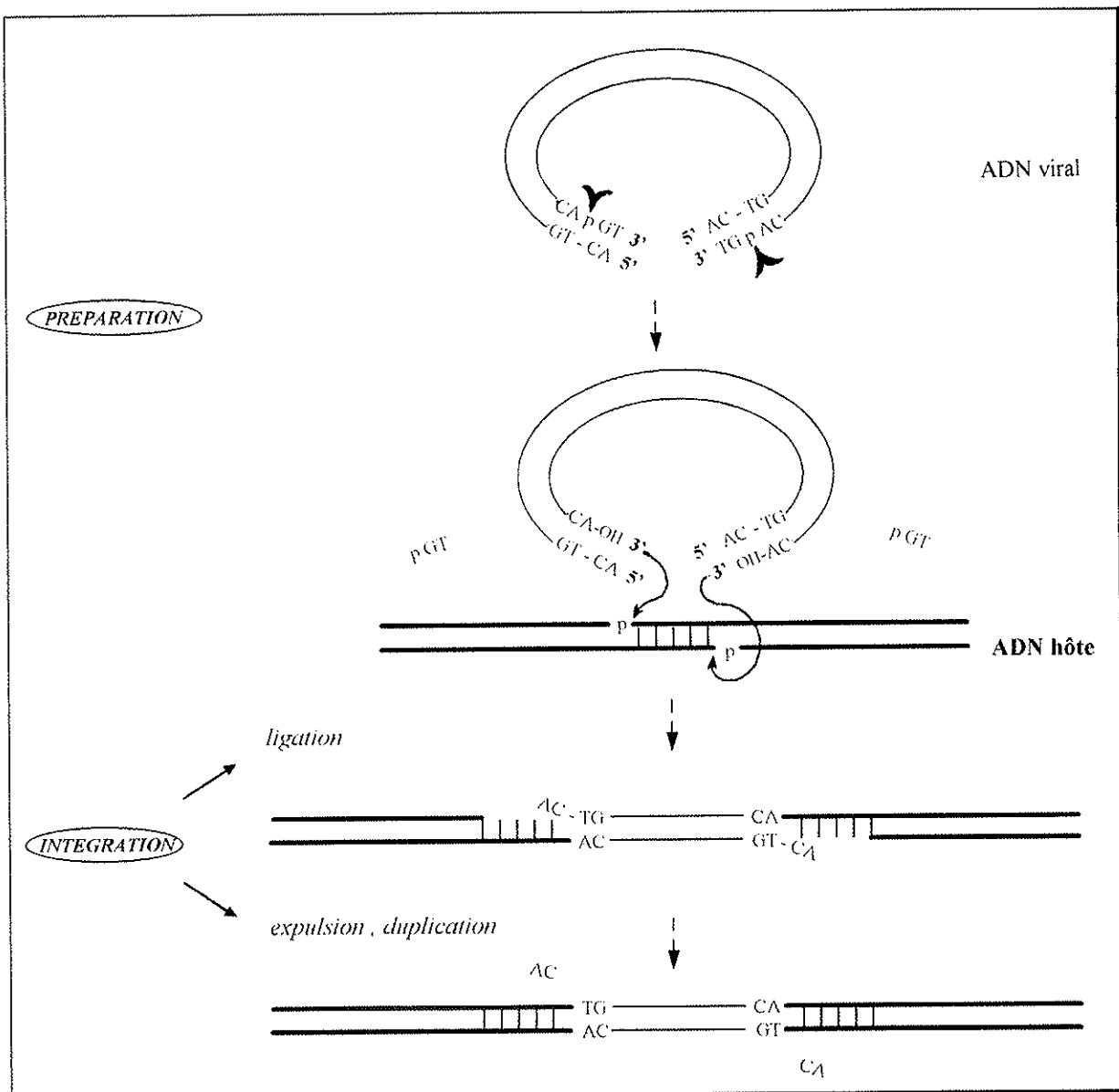


Figure 24 : modèle d'intégration de l'ADN rétroviral. Les séquences signalées correspondent aux extrémités de l'ADN du VIH-1 (102).

★ Après transport dans le noyau sous la forme d'un complexe nucléoprotéique, il se produit une étape de **transestérification**, au cours de laquelle les extrémités CA-3'-OH vont se lier à un phosphate aux extrémités 5' de l'ADN hôte préalablement clivé par l'intégrase au niveau du site d'insertion. Ce clivage a été réalisé sans spécificité pour une séquence d'ADN, mais de façon décalée, avec un espacement caractéristique pour chaque rétrovirus (rupture décalée de 4 paires de bases (pdb) pour le MLV, 5 pdb pour le VIH, 6 pdb pour l'ASLV). Après liaison des deux génomes, l'enzyme va expulser les deux nucléotides non appariés à l'extrémité 5' de l'ADN viral et dupliquer les bases de l'ADN cellulaire au niveau du site d'insertion.

Cette association des génomes du virus et de la cellule, appelée intégration, ou encore transfert de brin, résulte de l'**activité polynucléotidyltransférase** de l'intégrase et conduit à un provirus intégré, réduit de 2 pdb à chaque extrémité, et flanqué des séquences d'ADN cellulaire dupliquées.

★ Enfin, l'intégrase est capable, *in vitro*, de catalyser la réaction inverse du transfert de brin pour redonner l'extrémité CA-3'-OH de l'ADN viral et le site d'insertion dans lequel il a été scellé. Cette activité est appelée **désintégration**, son rôle biologique n'a pas été déterminé.

L'intégrase, qui réalise ainsi une étape critique du cycle de multiplication viral, constitue une cible antirétrovirale particulièrement attrayante, d'autant que les cellules hôtes ne fabriquent ni ne nécessitent une telle enzyme. La recherche d'inhibiteurs de l'intégrase n'a pourtant pas permis à ce jour de progresser dans les thérapeutiques de lutte contre les rétrovirus, comme l'a permis la recherche d'inhibiteurs des deux autres enzymes produites par le virus, la transcriptase inverse et la protéase. Ceci tient notamment au fait que les connaissances sur cette enzyme sont longtemps restées limitées.

Quelques molécules, naturelles ou synthétiques, ont cependant montré une capacité à inhiber l'intégrase, ouvrant des voies de recherche diverses. Citons par exemple la curcumine (121), les bis catéchols (109), le CAPE (cafféic acid phenylethyl ester) (66), qui présentent une analogie structurale, ou bien l'AZT sous sa forme monophosphatée (120).

Actuellement, un seul composé est en développement clinique. Il s'agit du **zintinavir** (AR177), un oligonucléotide de 17 bases, qui est entré en essai de phase I, à dose unique et par voie intraveineuse (28).

II. 4. 7. Action au niveau de la transcription :

C'est l'étape d'expression du génome viral intégré. Dans certaines conditions, l'ADN proviral va être exprimé, et c'est l'appareil cellulaire d'expression des gènes qui entre en jeu. Il conduit à la production d'un ARN génomique et de plusieurs ARNm, chacun correspondant à un gène du virus. Tous vont migrer vers le cytoplasme.

Les ARN formés ont la même origine (segment LTR) ; pour obtenir des ARNm spécifiques des différents gènes, ils doivent subir un processus d'épissage différentiel (découpages/réassemblages successifs). Les ARN les plus longs, c'est-à-dire mono ou non-épissés, correspondront aux gènes de structure (gag, pol et env), alors que les ARN courts (multiépissés) correspondront aux gènes régulateurs (42).

Deux facteurs viraux sont indispensables à l'expression du VIH :

➤ la protéine transactivatrice Tat (35, 88) : cette protéine de 86 acides aminés, codée par le gène tat, est capable de se lier au site TAR (Tat-responsive element) du segment LTR de l'ARNm commençant sa synthèse. Elle permet ainsi l'élongation normale des ARN et s'avère nécessaire à leur production en quantité suffisante. En l'absence d'interaction Tat-TAR, la production de protéines virales ne s'effectue plus. La protéine Tat est donc un transactivateur indispensable à la réplication virale, et l'inhiber équivaldrait à maintenir le virus à l'état latent.

➤ la protéine Rev (42, 96) : cette protéine de 116 acides aminés, codée par le gène rev, va se fixer au niveau d'une séquence cible de 240 nucléotides (RRE pour Rev-responsive element), localisée au centre de la région env, permettant ainsi aux ARN les plus longs d'échapper partiellement aux mécanismes d'épissage en les exportant du noyau vers le cytoplasme. En l'absence de la protéine Rev, les ARNm mono et non-épissés sont séquestrés dans le noyau de la cellule. Elle facilite donc la production des protéines de structure du virus.

La structure et le rôle de ces deux protéines régulatrices étant relativement bien connues, il est possible d'envisager la recherche d'inhibiteurs comme agents antiviraux. Différentes stratégies ont été proposées avec, par exemple, la recherche d'oligonucléotides antisens ou de ribozymes (voir chapitre II.4.11.3.), la recherche d'agents susceptibles d'inhiber l'épissage ou l'expression des gènes régulateurs ou de leurs produits, ou encore la recherche de substances qui vont mimer les protéines Tat et Rev et bloquer leur site de fixation sans entraîner d'activation (45).

Ainsi, il a été montré que des composés de petite taille pouvaient reconnaître la structure et des séquences de l'ARN viral, et se fixer sur des régions de celui-ci avec une spécificité et une affinité élevées. C'est le cas, par exemple, d'une petite molécule biologiquement active, la **néomycine B**, qui peut se lier spécifiquement sur la séquence RRE du VIH, empêchant l'interaction entre la protéine Rev et ce RRE (7).

D'autres composés, dérivant des benzodiazépines, ont montré un effet anti-Tat, en empêchant la liaison Tat-TAR. Ainsi, le **Ro 24-7429** a été testé avec succès sur des lignées cellulaires, présentant également une synergie avec l'AZT (42). Malheureusement, des essais cliniques conduits avec ce composé n'ont révélé aucune efficacité (35).

II . 4 . 8 . Action au niveau de la traduction des ARNm en protéines :

Les ARNm sont traduits en protéines virales par les ribosomes cellulaires dans le cytoplasme. On peut distinguer une phase d'expression précoce, au cours de laquelle sont synthétisées des protéines de régulation et des enzymes, et une phase tardive durant laquelle sont produites des protéines qui vont s'assembler pour former les virions.

L'intervention à ce niveau du cycle de réplication viral est délicate, puisque c'est la machinerie cellulaire qui entre en jeu, et permet la traduction en protéines. La seule possibilité thérapeutique consisterait à intervenir de façon spécifique sur les ARNm viraux, ce qui représente l'un des objectifs de la thérapie génique (chapitre II.4.11.3.).

II . 4 . 9 . Action sur les phénomènes de maturation des protéines virales :

Les processus de maturation vont débiter dès la synthèse des protéines virales, et se poursuivront après le bourgeonnement des nouveaux virions. Ainsi, diverses protéines issues des ARNm vont subir des processus post-traductionnels de maturation avec clivages protéolytiques, glycosylations, et myristylations. Les clivages protéolytiques font intervenir une enzyme virale, la protéase, et concerneront les polyprotéines précurseurs

provenant des gènes gag et gag-pol. Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol}. Les deux autres phénomènes font quant à eux appel à deux enzymes de la cellule hôte.

Ainsi, il est possible de distinguer au moins trois classes de drogues antirétrovirales agissant sur la maturation du virus :

- ⇒ les inhibiteurs de la protéase,
- ⇒ les inhibiteurs de la glycosylation,
- ⇒ les inhibiteurs de la myristylation.

La première classe est de loin la plus importante et la plus étudiée, puisqu'elle vise un constituant viral ; elle a permis d'élargir la palette des antirétroviraux disponibles en thérapeutique, avec la récente mise sur le marché de trois de ces inhibiteurs.

II. 4. 9. 1. L' inhibition de la protéase :

II.4.9.1.1. Rappels sur la protéase du VIH :

Il s'agit d'une protéine virale issue du gène pol. Elle est indispensable au clivage des polyprotéines Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol}.

Après une première étape au cours de laquelle les constituants viraux s'assemblent sous la surface de la cellule hôte et conduisent au bourgeonnement puis à la libération d'une particule qualifiée d'immature, les protéines précurseurs sont clivées par la protéase et vont s'organiser pour former la structure interne du virus qui comporte tous les éléments moteurs de la réplication virale. Ainsi, le précurseur Pr55^{gag} donne naissance à quatre protéines internes de structure matures, MA, CA, NC, et p6. La protéine de matrice MA constitue la couche externe de la capsid, la particule majeure de capsid CA forme le core conique du virus, la protéine NC s'associe étroitement à l'ARN génomique, alors que la protéine p6 participe à une structure de liaison entre l'extrémité du core et la membrane virale. Le précurseur Pr160^{gag-pol} génère les protéines internes sus-nommées, la transcriptase inverse, l'intégrase, et la protéase elle-même (figure 25) (35, 45).

De ce fait, l'activité protéasique est **indispensable à la production de virus matures infectieux**. L'inhibition de cette activité conduit, en effet, à la formation de particules virales défectueuses, désorganisées sur le plan structurel et fonctionnel, et donc incapables d'infecter de nouvelles cellules (52, 53).

Du point de vue structural, la protéase se présente sous la forme d'un homodimère symétrique de 11 kDa, constitué de deux sous-unités de 99 acides aminés, repliées sur elles-mêmes, et formant une cavité hydrophobe où viennent se loger les substrats de l'enzyme. Ce site catalytique est caractérisé par la présence de deux bras flexibles tripeptidiques (un par sous-unité), incluant un résidu aspartique, et capables d'« enlacer » le substrat et de reconnaître les séquences qui vont être clivées (192) (figure 26a,b,c).

La protéase appartient à la même famille (famille des aspartyl-protéases) que certaines enzymes cellulaires bien connues comme la rénine ou la pepsine. Elle en diffère cependant par sa structure symétrique, sa forme active dimérique, et sa taille plus petite (35, 102).

A l'heure actuelle, la protéase du VIH est reconnue responsable du clivage spécifique des protéines précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} au niveau de huit sites différents (30, 64). Ces sites de clivage peuvent être différenciés en trois groupes distincts selon les acides aminés au niveau desquels s'effectue la rupture (64).

Dans le clivage de type 1, la scission s'effectue entre une proline et un acide aminé aromatique (phénylalanine ou tyrosine). Du fait de la non-hydrolyse de ces liaisons par les endopeptidases de mammifères, il est raisonnable d'envisager que des inhibiteurs dont la structure serait proche de ces séquences dipeptidiques, possèderaient une certaine spécificité vis-à-vis de l'enzyme.

Le clivage de type 2 se produit entre des résidus leucine et alanine et rappelle l'hydrolyse de la séquence leucine-valine rencontrée lors du processus de maturation de l'angiotensinogène par la rénine. Il est alors possible d'envisager la sélection de composés analogues de la rénine pour prévenir le processus protéolytique.

Enfin, le clivage de type 3 autorise la conception d'inhibiteurs basée sur la nature symétrique, à la fois de l'enzyme et des séquences d'acides aminés des substrats naturels hydrolysés.

II.4.9.1.2. les inhibiteurs de la protéase :

Contrairement au procédé classique de criblage, où l'on recherche l'éventuelle activité antivirale de composés déjà synthétisés, la recherche d'inhibiteurs de la protéase (IP) a pu bénéficier non seulement des connaissances acquises depuis une dizaine d'années sur les inhibiteurs d'autres protéases humaines comme la rénine, mais aussi de la connaissance de la structure exacte de l'enzyme, de son site actif, et de ses substrats.

Ainsi, plusieurs **approches rationnelles** ont pu être envisagées (53, 64, 192).

L'approche initiale fut la modélisation de composés, basée sur l'analogie des séquences d'acides aminés des substrats, et sur les mécanismes de clivage de ces substrats. On a alors cherché à remplacer les liaisons scissibles par des isostères non hydrolysables. Cette approche a permis la synthèse de composés, peptidiques ou non, qui vont mimer et inhiber de façon compétitive les substrats de la protéase.

La seconde approche s'appuie sur la structure symétrique de l'enzyme et de son site actif. Des inhibiteurs de type C2 symétriques, partiellement peptidiques, et complétant le site actif de l'enzyme, ont été conçus. Leur structure symétrique leur conférerait une affinité plus importante pour la protéase du VIH que les substrats physiologiques, ainsi qu'une spécificité d'action puisque les sites actifs des aspartyl-protéases humaines sont asymétriques. Leur développement est cependant actuellement compromis en raison de leur très faible solubilité.

Une autre approche, enfin, est basée sur l'étude structurale et la complémentarité enzyme/inhibiteur. Cette stratégie utilise la modélisation d'une image négative de la cavité contenant le site actif, à partir de la structure cristalline de l'enzyme. Elle a permis de sélectionner des produits non peptidiques susceptibles d'interagir avec le site enzymatique. C'est le cas par exemple de l'halopéridol, point de départ pour la synthèse d'analogues plus actifs.

De nombreuses molécules ont ainsi pu être modélées, avec des structures différentes. L'utilisation des IP en thérapeutique est très récente, la mise sur le marché des premiers composés date de la fin de l'année 1996. Actuellement, trois inhibiteurs de la protéase du VIH ont reçu une AMM en France, le **saquinavir** (Invirase[®]), le **ritonavir** (Norvir[®]), et l'**indinavir** (Crixivan[®]). Le **nelfinavir** (Viracept[®]) dispose d'une ATU, et quelques autres molécules sont en développement clinique (figure 27, tableau 9).

Contrairement aux inhibiteurs de la transcriptase inverse, qui agissent dans la cellule dès le début de l'infection, les IP ne peuvent agir que sur des cellules déjà productives infectées, dans lesquelles ils vont bloquer la maturation et la propagation de l'infection vers d'autres cellules. Comme la majorité des cellules productrices du virus ont une durée de vie courte, cela se traduit secondairement par une baisse de la production virale dans l'organisme, visible sous la forme d'une chute de la virémie plasmatique (185).

Les IP vont inhiber l'activité de la protéase de façon compétitive. En se fixant au niveau du site actif, ils entraînent une modification de la conformation de l'enzyme, avec une fermeture des bras flexibles, rendant la poche active inaccessible au substrat naturel (52) (figure 26d).

D'une manière générale, les IP sont, *in vitro*, de **puissants inhibiteurs de la réplication des VIH** (avec de petites différences pour le VIH-2) avec des CI50 de l'ordre de la nanomole. Ils sont peu toxiques vis-à-vis des cellules et présentent des IS>1000 (35, 45, 53). L'efficacité antivirale *in vivo* est dose-dépendante, et se manifeste, en monothérapie, par une augmentation du nombre de lymphocytes CD4 et une chute de la CV plasmatique allant de 0,5 à 2,5 log₁₀ selon les molécules et les doses considérées (61). Mais ces effets s'estompent peu à peu en raison de l'apparition de résistances. L'association à des analogues nucléosidiques permet d'accentuer cette efficacité et de la prolonger dans le temps.

L'efficacité sur le plan clinique a également été démontrée avec le saquinavir et le ritonavir, chez des sujets à un stade de peu évolué à avancé de la maladie, en réduisant la survenue des infections opportunistes et la mortalité (étude NV14 256) (53, 69).

L'activité antivirale des différents composés inhibant la protéase est en fait étroitement liée à leurs **caractéristiques pharmacocinétiques** (45, 53, 61, 192). La biodisponibilité varie fortement d'un composé à un autre. Elle est bonne pour l'indinavir, le ritonavir, et le nelfinavir ; par contre elle apparaît très faible pour le saquinavir (4 à 5 %), ce qui contraint à utiliser des quantités importantes. Le développement d'une nouvelle formulation, qui permettrait d'augmenter cette biodisponibilité, est actuellement en cours.

La fixation aux protéines plasmatiques est également un facteur important, en particulier la liaison à une α 1-glycoprotéine acide du plasma ou orosomucoïde, qui empêche toute pénétration cellulaire et rend la molécule inefficace. Le développement de certains composés a été interrompu pour cette raison.

La plupart des IP présentent l'inconvénient d'**interférer avec le cytochrome P-450 hépatique** (52, 53). Ils vont donc modifier la pharmacocinétique de nombreux agents faisant intervenir un métabolisme hépatique et exposer à des interactions médicamenteuses chez les sujets infectés par le VIH souvent multitraités (68, 149). C'est plus particulièrement le cas de l'indinavir et du ritonavir qui sont de puissants inhibiteurs du cytochrome P-450.

Les molécules actuellement disponibles en pratique clinique bénéficient d'une **tolérance acceptable** (185), permettant de les utiliser à des doses quotidiennes importantes. Mais il existe des effets secondaires, variables selon les composés, qui peuvent poser un problème de compliance des malades au traitement (tableau 9).

Les IP ne sont pas épargnés par l'**acquisition de résistances** (52, 69). Elles résultent de la sélection de mutations sur le gène de la protéase, qui s'accumulent **progressivement** au cours du temps, et dépendent du nombre et de l'ordre de leur apparition. Le niveau de résistance croît à mesure qu'un plus grand nombre de mutations apparaît. Ces mutations affectent trois zones variables de l'enzyme et induisent des changements conformationnels qui gênent l'interaction enzyme/inhibiteur. Les codons concernés par les mutations et leur degré d'importance dans le niveau de résistance sont variables selon les composés, offrant des profils de résistance différents. Toutefois, l'existence de points de mutations communs, et fortement associés à la résistance, explique les résistances croisées entre certains inhibiteurs. Elles concernent essentiellement l'indinavir et le ritonavir (tableau 10).

L'avènement de cette nouvelle classe thérapeutique en 1996 a véritablement marqué un tournant dans la prise en charge thérapeutique de l'infection à VIH. Bien qu'elle bénéficie d'une tolérance acceptable et d'une efficacité antivirale puissante, l'apparition de résistances apparaît comme une limite à l'utilisation de ces composés en monothérapie. Ils constituent néanmoins des candidats de choix aux associations, que ce soit au sein de cette même famille, puisqu'ils possèdent des profils différents de tolérance et de résistance, mais surtout avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse, l'action sur deux sites différents du cycle de réplication étant complémentaire. Il reste de toute façon à définir l'intérêt à long terme de ces nouveaux agents antirétroviraux.

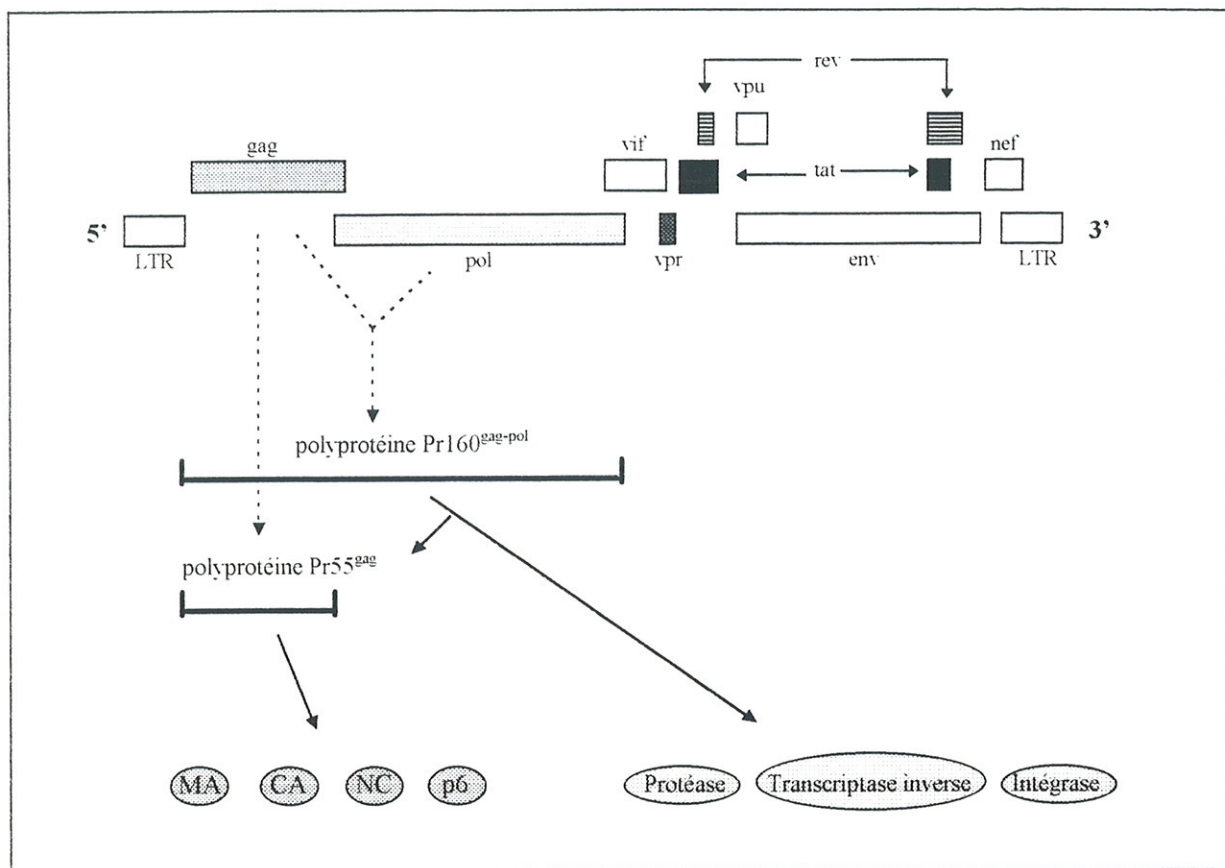


Figure 25 : production des protéines matures du VIH à partir des gènes gag et pol.

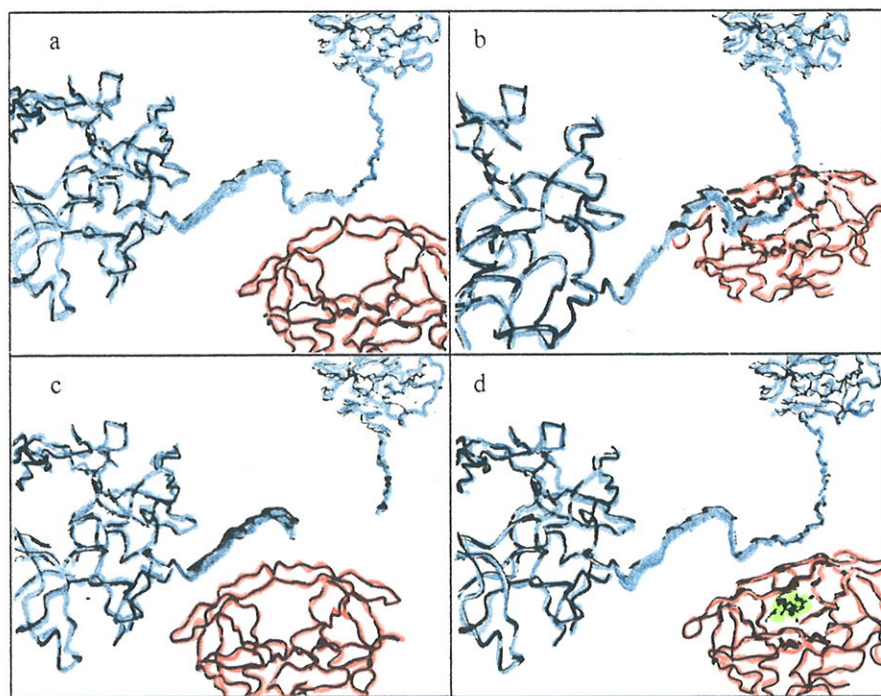


Figure 26 : représentation des événements associés au clivage protéolytique du VIH par la protéase et à son inhibition. (a) : polyprotéine (en bleu) attaquée par la protéase (en rouge) : (b) : polyprotéine encastrée entre les bras de la protéase au niveau du site actif : (c) : polyprotéine clivée par la protéase : (d) : protéase associée à un inhibiteur (en vert) au niveau du site actif. Les bras sont fermés et empêchent l'insertion de la polyprotéine (52).

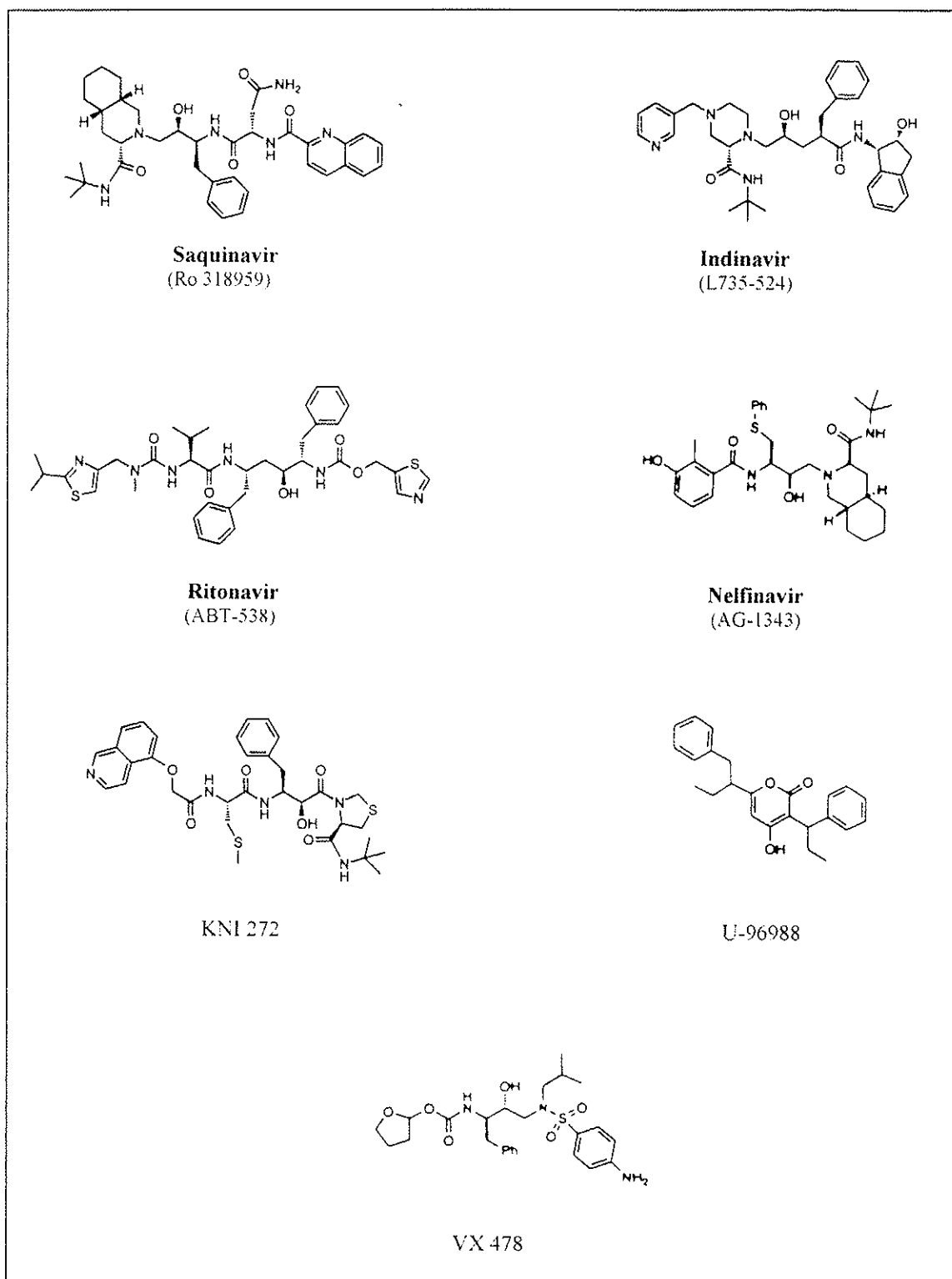


Figure 27 : structures de quelques inhibiteurs de la protéase du VIH (192).

| DCI | Abréviation | Nom commercial | Laboratoire | Principaux effets indésirables | Situation de développement |
|-----------------------|-------------|-----------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| Saquinavir (mésylate) | Ro-31-8959 | INVIRASE [®] | Roche | Intolérance digestive à doses élevées | AMM (1996) |
| Ritonavir | ABT 538 | NORVIR [®] | Abbott | Troubles digestifs ++ Paresthésies péri-buccales Troubles du goût ↗ transaminases ↗ triglycérides | AMM (1996) |
| Indinavir (sulfate) | MK-639 | CRIVAN [®] | Merck Sharp Dohme | Lithiase rénale ↗ bilirubinémie ↗ transaminases | AMM (1996) |
| Nelfinavir (mésylate) | AG-1343 | VIRACEPT [®] | Agouron | Troubles digestifs + (1/3 des cas) | ATU |
| | VX 478 | | Glaxo-Wellcome/Vertex | | Essais phase II |
| | 141 W 94 | | Glaxo-Wellcome/Vertex | | Essais phase II |
| Témérix | U-140690 | | Pharmacia-Upjohn | | Essais phase I |
| | KNI 241 | | Nikko Kyoto Pharmaceutical | | |
| | ABT 378 | | Abbott | | |

Tableau 9 : principaux inhibiteurs de la protéase du VIH.

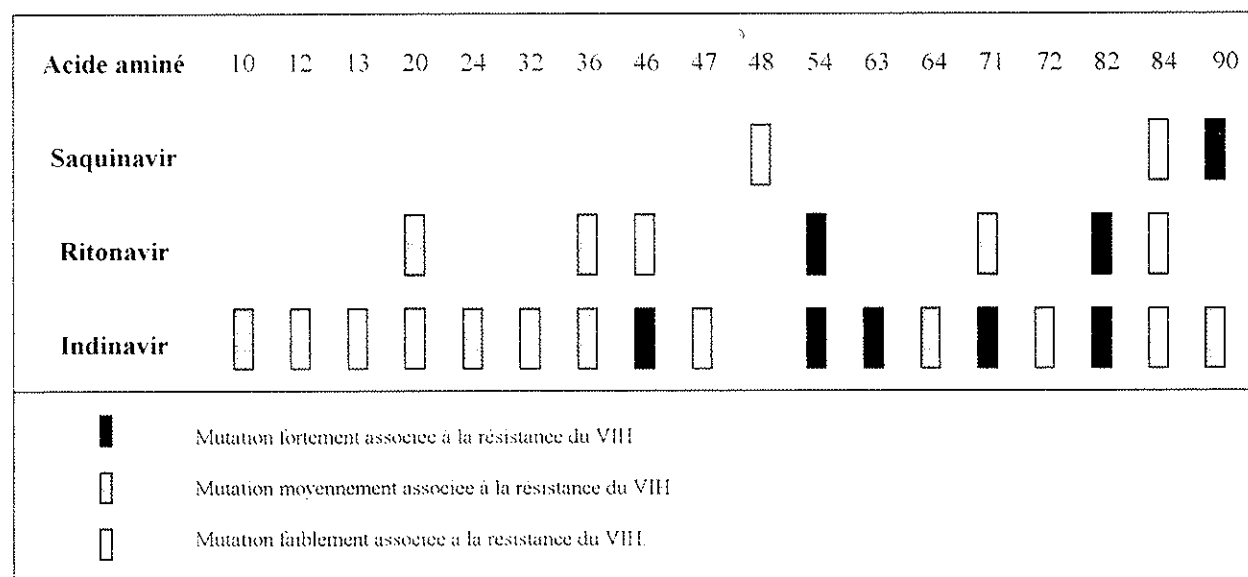


Tableau 10 : profil de mutation *in vivo* des inhibiteurs de la protéase du VIH (69).

II. 4. 9. 2. L'inhibition de la glycosylation :

La glycosylation constitue une étape critique pour **l'infectivité des virions**. En effet, la maturation des protéines d'enveloppe, à partir de la polyprotéine précurseur issue du gène env (Pr160^{env}), fait intervenir une dimérisation et des glycosylations au niveau du réticulum endoplasmique, un clivage dans l'appareil de Golgi, et une exportation vers la surface de la cellule des produits clivés : les glycoprotéines transmembranaire et de surface. La forte glycosylation de la gp120 du VIH-1 est nécessaire pour obtenir une conformation fonctionnelle (196), et c'est la partie glycosylée qui intervient lors de l'interaction avec les anticorps, lors de la liaison au récepteur membranaire, et lors de la pénétration dans la cellule (111).

Des inhibiteurs de la glycosylation pourraient donc constituer un atout supplémentaire dans la thérapeutique antirétrovirale. L'obtention de tels composés est cependant rendue délicate par le fait que les enzymes qui catalysent ces réactions (des α -glucosidases) sont cellulaires et non virales, exposant à des problèmes de toxicité.

La **catanospermine** et la **N-butyl-1-déoxynojirimycine** sont des inhibiteurs de ces enzymes. Structurellement, ce sont des analogues azotés du glucose (figure 28) (129). Ils sont capables, *in vitro*, de bloquer l'infectivité du VIH et d'autres rétrovirus, et d'empêcher la formation de syncytia, mais à des doses fortes (42, 45). L'utilisation de tels composés ou de leurs dérivés en thérapeutique reste encore du domaine théorique du fait de leur manque d'efficacité et de leur mauvaise tolérance.

II. 4. 9. 3. L'inhibition de la myristylation :

Au cours de la maturation des polyprotéines Gag et Gag-Pol, un acide gras, l'acide myristique, va être fixé à leur extrémité N-terminale, c'est-à-dire au niveau de la protéine de matrice MA qui, rappelons le, constituera la couche externe de la capsid.

Ce processus, appelé myristylation, joue un rôle crucial dans l'**association de ces polyprotéines précurseurs à la membrane plasmique** de la cellule hôte (le fragment myristate permet des interactions hydrophobes avec

l'intérieur de la double couche lipidique membranaire), et par conséquent dans le bourgeonnement de la particule virale (198). Il serait également important pour le clivage protéolytique des protéines précurseurs qui conduit, entre autres, à la protéine MA myristylée. Cette protéine mature possède d'autres fonctions au cours des étapes initiales du cycle de réplication puisqu'elle permet, en association avec la protéine Vpr, l'importation nucléaire du complexe de préintégration (81, 198).

Des inhibiteurs de la myristylation, qui vont entraîner un blocage de l'addition de l'acide myristique, présentent donc un intérêt théorique certain comme inhibiteurs de la réplication virale. Quelques composés ont été identifiés, comme par exemple des analogues d'acides gras, capables d'entrer en compétition avec l'acide myristique. Ils ont montré une certaine efficacité *in vitro*, mais se sont révélés toxiques pour les cellules (45). L'intervention d'une enzyme cellulaire dans le processus de myristylation rend difficile la recherche d'inhibiteurs atoxiques et n'a pas permis jusqu'à ce jour de mettre en évidence des composés intéressants.

II. 4. 10 . Action sur le processus de bourgeonnement :

Après assemblage des constituants viraux au niveau de la membrane plasmique, il se forme un bourgeon viral qui conduit à la libération d'un nouveau virion hors de la cellule infectée.

Les candidats inhibiteurs de cette étape sont principalement les **interférons** (IFN). Ils furent les premiers inhibiteurs de la réplication du VIH à avoir été étudiés.

Ce sont des substances de nature glycoprotéique, produites naturellement par les cellules en réponse à l'action d'inducteurs divers (virus, antigènes, toxines, ...), et douées de propriétés immunomodulatrices, antiprolifératives et antivirales. Plusieurs IFN ont été caractérisés selon leur origine, leurs propriétés antigéniques et fonctionnelles, et les agents induisant leur production. Les IFN α et β possèdent une activité antivirale plus nette, alors que les IFN γ sont plutôt marqués par une activité immunomodulatrice (35).

Il a été démontré que l'activité antivirale des IFN se manifestait à plusieurs étapes du cycle viral (pénétration, décapsidation, synthèse des ARNm et des protéines, assemblage) (110). L'IFN- α agit

principalement à une phase tardive de la réplication du VIH (35, 60). Il serait capable de bloquer l'expression d'un ou plusieurs gènes viraux, en particulier vpu, dont le produit est nécessaire à l'assemblage et au relargage des virions. Il en résulte une accumulation de virions dans le cytoplasme des cellules traitées sans altération de leur viabilité. *In vitro*, il existe une synergie d'action de l'IFN- α associé à des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse. Les essais réalisés chez l'homme se sont cependant montrés jusqu'à présent décevants, y compris lors d'association à des analogues nucléosidiques (l'association avec l'AZT ou la ddI n'a pas permis de mettre en évidence un bénéfice de la combinaison) (61).

II. 4. 11. Autres niveaux d'action des drogues antirétrovirales :

II. 4. 11. 1. Action sur des protéines virales :

II.4.11.1.1. La protéine NC p7 :

La NC p7 ou protéine de nucléocapside p7 apparaît depuis peu comme une nouvelle cible intéressante dans la lutte contre les rétrovirus.

Il s'agit d'une petite protéine basique de 72 acides aminés, synthétisée à partir des polyprotéines précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} par clivage protéolytique, et présente dans le core des virions matures, étroitement associée au dimère d'ARN génomique et à l'ARNt qui sert d'amorce à la réplication du virus (186).

Elle est retrouvée chez les oncovirus et les lentivirus, mais n'est pas présente chez les spumavirus (187).

Sa structure particulière lui a donné son nom de « **protéine en doigt de zinc** ». En effet, elle contient deux séquences très bien conservées **Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys** (ou Cys = cystéine, His = histidine, X = acide aminé moins bien conservé), formant des pseudo-cercles, et à l'intérieur desquelles se trouve un atome de zinc. Ainsi, le zinc est chélaté dans une structure tétraédrique stable à quatre acides aminés, trois cystéines et une histidine (CCHC) (194). Ces doigts de zinc semblent nécessaires à la fois au cours des étapes initiales et tardives du cycle de réplication des rétrovirus.

Cette protéine constitue un élément essentiel de la structure du virus et possède de **multiples fonctions** (187) :

➔ elle semble nécessaire à l'infection initiale des cellules cibles en conduisant la rétrotranscription et en accroissant son efficacité ; elle permet l'initiation et l'élongation des transcrits naissants, et l'augmentation de l'efficacité du template switching au cours de la transcription inverse.

➔ elle sélectionne et dimérise le génome viral (cette dimérisation est essentielle à la réplication),

➔ elle encapside le génome ARN dimère et l'incorpore dans le bourgeon viral,

➔ enfin, elle joue un rôle protecteur du génome vis-à-vis de l'action de l'intégrase, et des nucléases extra et intracellulaires.

Des études basées sur des modifications du motif en doigt de zinc (CCHC remplacé par exemple par CCCC ou CCHH) ont mis en évidence une encapsidation défectueuse de l'ARN, et la production de particules non infectieuses (84, 186).

Cette **plurifonctionnalité** et l'**apparente immutabilité** de cette structure en doigt de zinc en fait une **cible particulièrement intéressante** pour les composés à visée antirétrovirale.

La recherche d'inhibiteurs de la NCp7 s'est orientée vers la production de molécules qui pourraient rompre spécifiquement la liaison NCp7-Zinc, avec en particulier des produits soufrés, rendant la NCp7 inopérante. En effet, les atomes de soufre des résidus cystéine peuvent subir une attaque électrophile par certains groupements fonctionnels (composés aromatiques C-nitroso, disulfides, disulfoxydes, maléimides, thiurams,...), provoquant une éjection de l'atome de zinc (158).

Ainsi, de nombreux composés font l'objet d'essais, avec par exemple le 3-nitrosobenzamide (NOBA), des dérivés disulfides, des benzamides disulfide substitués (DIBAs) et leurs produits de cyclisation (benzisothiazolones), des dithianes et dithiolanes, etc... (figure 29).

Quelques molécules affichent une certaine efficacité vis-à-vis du VIH-1 (y compris les souches monocytotropes et résistantes à d'autres antiviraux), du VIH-2 et du SIV. Elles inhibent la production virale, entraînent la production de virions non infectieux, et montrent une forte synergie en association avec les antirétroviraux couramment employés (159). Elles n'ont cependant pas d'action sur la fixation du virus aux

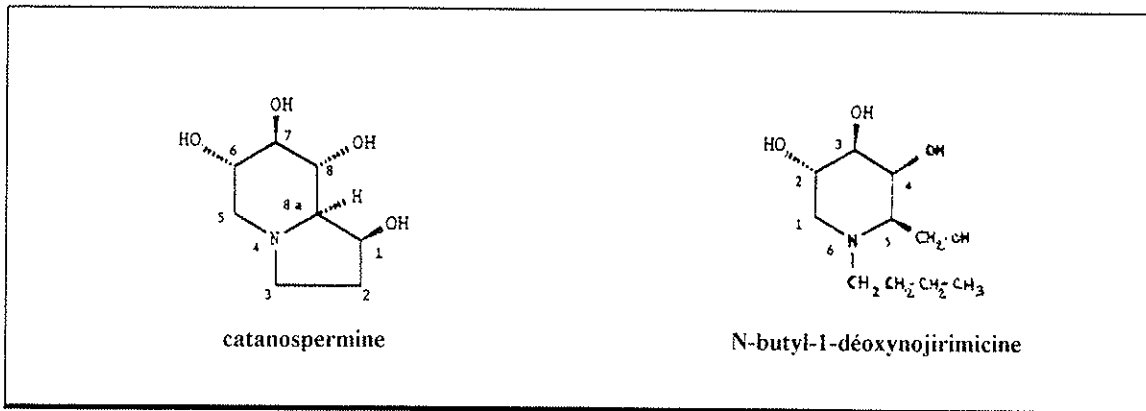


Figure 28 : structures de quelques inhibiteurs de la glycosylation (129).

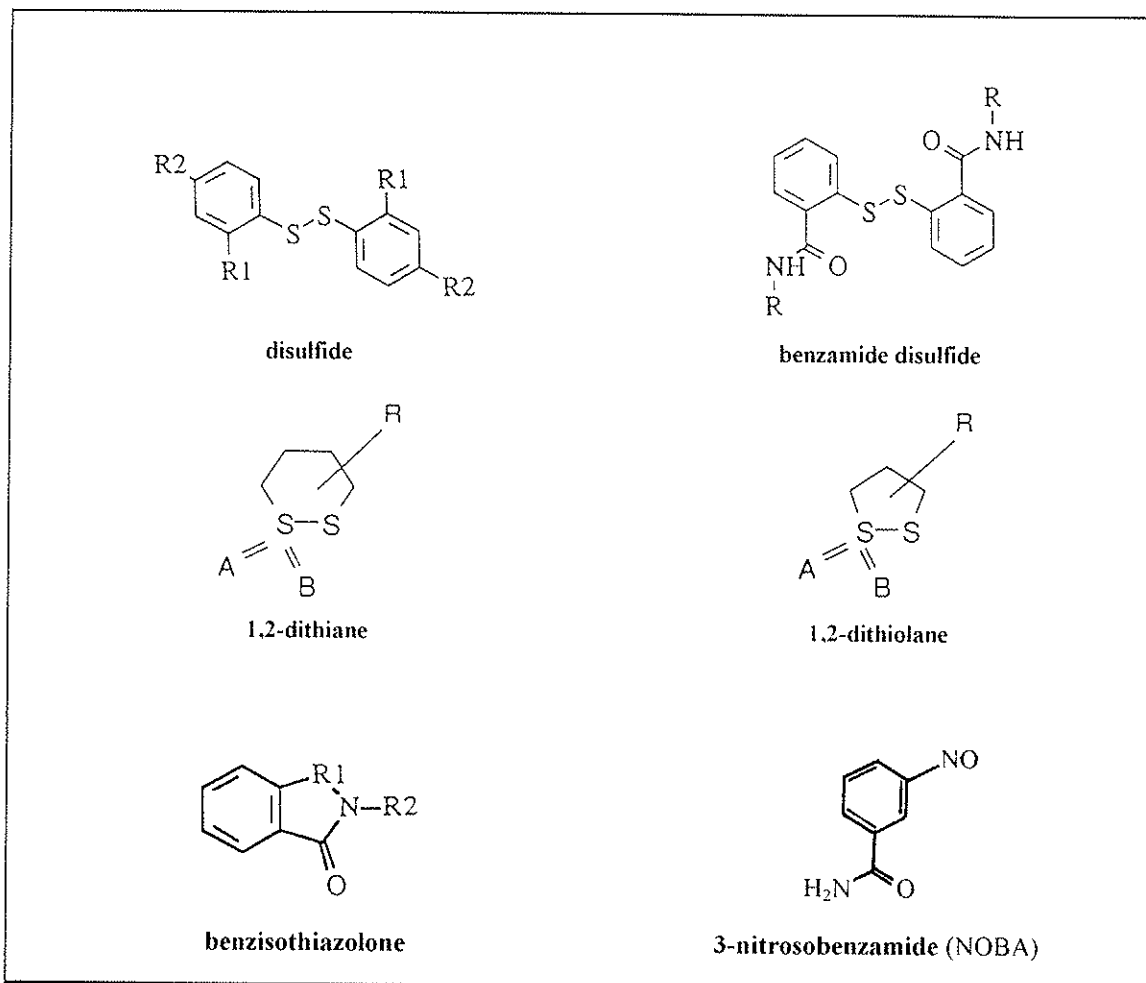


Figure 29 : structures de quelques inhibiteurs de la NC p7 (158, 186).

cellules cibles, n'ont aucune influence sur l'activité de la transcriptase inverse et de la protéase, et n'agissent pas sur les processus de myristylation. La production de virions non infectieux serait notamment la conséquence d'une interaction moléculaire entre les doigts de zinc et les protéines précurseurs Gag, rendant cette dernière inaccessible à la protéase (187, 158).

L'évaluation *in vitro* montre, pour certains composés, de bonnes constantes d'inhibition et des IS acceptables, mais il reste à définir leur comportement *in vivo*, d'autant que les protéines à doigt de zinc sont répandues dans les cellules (84). Il est évident qu'il faudra jouer sur les différences d'affinité, tout comme cela a été fait avec le développement d'antiprotéases virales et d'inhibiteurs de polymérase virales que sont les inhibiteurs de la transcriptase inverse.

II.4.11.1.2. Les protéines de régulation :

La complexité de la réplication du VIH tient en particulier à l'existence de nombreux gènes régulateurs. Les protéines codées par ces gènes peuvent constituer des cibles intéressantes, comme nous l'avons déjà évoqué avec les protéines Tat et Rev. Les autres protéines régulatrices, quant à elles, sont pour le moment plus difficilement accessibles lors d'un traitement à visée antirétrovirale du fait de la connaissance encore incomplète de leurs fonctions et de leurs mécanismes d'action.

II. 4. 11. 2. Action sur des facteurs de la cellule hôte :

II.4.11.2.1. La ribonucléotide réductase :

Récemment, des inhibiteurs de la ribonucléotide réductase (RR) ont attiré l'attention pour leur propriétés antivirales *in vitro*. L'inhibition de cette enzyme cellulaire entraîne une diminution de la taille du pool de déoxynucléosides triphosphatés (dNTP) intracellulaires et plus particulièrement de dATP. Or, l'efficacité de la transcriptase inverse est hautement dépendante du taux intracellulaire de dNTP. Donc, même si les inhibiteurs de

la RR ne sont pas des agents antiviraux directs, ils peuvent inhiber la réplication du VIH en diminuant la synthèse de l'ADN viral de façon indirecte (78, 161).

Ainsi, l'**hydroxyurée**, utilisée en thérapeutique comme antinéoplasique cytostatique, s'est montrée active *in vitro* sur la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes du sang périphérique et les macrophages. Elle inhibe également le SIV, mais moins efficacement dans les macrophages (115). Son mode d'action consiste à piéger le résidu libre tyrosyl essentiel à l'activité enzymatique (78).

L'acide **D-aspartique β hydroxamate** (DAH) inhibe lui aussi la RR, mais des mécanismes supplémentaires pourraient être impliqués dans l'inhibition de la réplication virale (156).

Des essais cliniques ont été entrepris et n'ont cependant pas montré de bénéfice thérapeutique lors de l'utilisation en monothérapie (pas de modifications des paramètres immunologiques et virologiques des sujets traités par hydroxyurée) (78).

Une action synergique a été observée, *in vitro*, lors de l'association de l'un de ces composés à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (AZT, ddI, ddC) (74, 78, 116) ; l'évaluation *in vivo* de telles associations est en cours.

II.4.11.2.2. La cyclophiline A : (21, 59, 178)

Il s'agit d'une protéine cellulaire, présente en quantité abondante dans le cytosol, et qui a la capacité de former un complexe avec certaines protéines virales. La cyclophiline A (Cyp A) est incorporée dans les virions, de type VIH-1 uniquement, par le biais d'une interaction avec la polyprotéine précurseur Gag, impliquant le domaine CA. Elle n'est pas retrouvée dans d'autres rétrovirus.

Elle présente une activité peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase et agit au niveau du déploiement des protéines Gag qui, rappelons le, jouent un rôle important dans le transport nucléaire du complexe de préintégration et dans l'assemblage des particules virales. Il semble que l'**interaction Pr55^{gag} / Cyp A** soit **essentielle à la réplication** du VIH-1, et en particulier à la formation de virions pleinement infectieux.

D'où l'idée de rechercher des **inhibiteurs de cette protéine cellulaire**.

■ Cyp A possède une haute affinité pour la ciclosporine A qui est capable d'inhiber son activité isomérase. Des **analogues de la ciclosporine A**, mais dénués de l'effet immunosuppresseur, ont été produits, et ont montré *in vitro* une activité anti-VIH-1 sélective et puissante. Cette activité est liée à la possibilité de se fixer sur Cyp A et par conséquent de gêner la formation du complexe Gag / Cyp A.

■ Le composé **SDZ NIM 811** s'est révélé intéressant avec une CI50 de l'ordre d'une dizaine de nanomoles. Des expériences ont montré qu'il interfère à deux étapes du cycle de réplication : d'une part au niveau du transport du complexe de préintégration dans le noyau, et d'autre part au niveau de l'assemblage des particules virales. En présence de ce composé, les particules produites sont moins infectieuses et porteuses de défauts les rendant incapables de rétrotranscrire leur ARN correctement.

L'action sur des facteurs cellulaires laisse penser qu'il y a moins de risque de voir se développer des mutants résistants qu'avec des agents antiviraux directs. Les études se poursuivent donc sur ces voies, sachant toutefois que l'identification d'une cible cellulaire plutôt que virale pose le problème de la sélectivité de l'effet avec des risques de toxicité.

II. 4. 11. 3. La thérapie génique :

La thérapie génique consiste à utiliser des séquences d'ADN ou d'ARN, qui sont transférées dans les cellules, et qui vont interagir avec leurs cibles intracellulaires soit directement, soit après expression en ARN ou en protéines. Les possibilités d'action sont multiples, et font l'objet de nombreuses recherches, d'autant que les domaines d'application sont très diversifiés (traitements des maladies génétiques, antiviraux, anticancéreux, ...).

▲ Ainsi, les années 1980 ont vu le développement de la stratégie antisens avec les **oligonucléotides antisens** (35, 126, 150). Ce sont de petits ARN ou ADN, obtenus par synthèse, et dont la structure est complémentaire de certaines séquences du génome viral ou d'un ARNm viral. Ils sont capables de se fixer

spécifiquement sur ces séquences du virus (véritable hybridation moléculaire), entraînant un blocage de leur expression ou de leur fonction.

In vitro, les oligonucléotides antisens dirigés contre certaines séquences du VIH, sont capables d'inhiber la réplication du virus à des concentrations de l'ordre de la millimole. Cependant, ces composés posent beaucoup de problèmes. Il est difficile, en effet, d'obtenir des molécules :

- spécifiques : la possibilité théorique d'interaction avec les gènes de la cellule hôte n'est pas écartée,

- stables vis-à-vis des endonucléases cellulaires : pour augmenter cette stabilité, il est nécessaire de modifier l'enchaînement phosphodiester. Ainsi ont été préparés des dérivés méthylphosphonates, phosphoamidates, ou phosphorothioates, plus stables (figure 30) (45, 130),

- présentant une bonne pénétration et distribution intracellulaire.

Toute la difficulté va être de faire parvenir l'antisens intact et au bon endroit. Un autre problème réside dans l'éventuelle apparition de mutations au niveau des séquences cibles, ce qui diminuerait leur reconnaissance par l'oligonucléotide antisens.

Le **GEM 91**, premier antisens à visée anti-VIH, est un phosphorothioate de 25 bases, complémentaire du site d'initiation de l'ARNm issu du gène gag. Il va s'hybrider à cet ARNm, empêchant la synthèse de protéine virale, mais peut aussi se fixer au génome et empêcher la transcription. Ce composé s'est montré hautement actif *in vitro* contre différentes souches de VIH-1, y compris des souches AZT résistantes (61, 156). Malgré des premiers résultats décevants avec ce composé lors d'essais chez l'homme, le concept reste intéressant (185). D'autres cibles que le gène gag méritent d'être étudiées, comme par exemple les gènes de régulation tat et rev, dont l'importance a été évoquée au cours de la transcription.

▲ Les **ribozymes** constituent une seconde approche (28, 136, 160). Il s'agit de petites molécules d'ARN qui possèdent, en plus des oligonucléotides antisens, une activité enzymatique capable d'inactiver une séquence spécifique de l'ARNm ou de l'ARN viral. Ces composés seraient potentiellement plus puissants que les antisens, puisqu'une molécule de ribozyme pourrait cliver plusieurs molécules d'ARN. Ils sont cependant confrontés aux mêmes problèmes.

▲ Une **voie**, dite **toxigénétique**, consisterait à introduire une séquence d'ADN dont l'expression, conditionnée par la présence du virus, aboutirait à une toxine cellulaire, provoquant ainsi la mort des cellules infectées (35).

▲ Une autre **voie**, dite **d'immunisation intracellulaire**, consisterait à rendre les cellules infectées « résistantes » au virus par l'introduction d'un gène viral porteur d'une « mutation négative dominante » (136). Par exemple, l'introduction dans une cellule d'un gène de la capsid virale, codant pour une protéine dysmorphique et capable de participer à la construction capsidale, fausserait cette construction lors de l'infection par le virus. De la même façon, un gène de protéine de capsid modifié, codant également pour une nucléase, entraînerait une destruction du génome viral dans la capsid.

Ces quelques exemples d'approches montrent combien la thérapie génique est attrayante en théorie, tant par la diversité des mécanismes mis en jeu que par celle des niveaux d'action dans le cycle de réplication viral. Elle constitue ainsi une probable voie d'avenir, mais doit faire l'objet de nombreuses recherches, les obstacles théoriques, expérimentaux et éthiques étant multiples.

II. 4. 11. 4. L'immunomodulation :

L'infection par le VIH étant une lutte entre le virus et la réponse immunitaire, les thérapeutiques visant à **restaurer ou renforcer certaines fonctions immunitaires**, en association à des traitements antirétroviraux puissants, deviennent de plus en plus pertinentes (185, 191).

Pour cela, de nombreuses pistes sont à l'étude (45, 126) avec :

- ➔ les immunostimulants chimiques,
- ➔ la reconstitution cellulaire et humorale, avec notamment des greffes de moelle ou des transfusions autologues de lymphocytes CD8+,
- ➔ la vaccination des sujets infectés,
- ➔ ou plus récemment les **cytokines** : il s'agit de substances naturelles qui permettent aux cellules du système immunitaire de communiquer entre elles, et qui agissent localement, là où s'introduisent les

agents infectieux. Elles regroupent les interférons (capables d'interférer avec la multiplication des virus, ils jouent un rôle important dans les réactions antitumorales et immunitaires), les interleukines (IL) (fournissent aux cellules les signaux nécessaires à leur différenciation en cellules matures actives, tueuses ou productrices d'anticorps, et à leur inhibition), les chémokines (RANTES, MIP-1 α et β , ...), et divers facteurs tels que les TNF (tumor necrosis factor) ou le CAF (CD8 T cell antiviral factor) (180, 191).

Les cytokines présentent deux caractéristiques importantes. D'une part, elles sont pléiotropiques, c'est-à-dire capables d'agir sur différents types cellulaires, à condition que ces cellules expriment à leur surface le récepteur spécifique de la cytokine. Chaque cytokine peut donc avoir de multiples effets. D'autre part, elles sont redondantes puisque certaines d'entre elles sont capables d'exercer le même type d'action sur une cellule cible.

Le rôle des cytokines dans la modulation de la réplication du VIH est complexe : certaines cytokines sont capables de l'inhiber, d'autres au contraire l'augmentent (figure 31). Mais les effets sont très variables selon le modèle cellulaire et le virus utilisés, et la transposition *in vivo* des résultats obtenus *in vitro* est délicate (14). Par exemple, l'IL-2, qui augmente la réplication virale *in vitro*, semble avoir au contraire un effet bénéfique *in vivo*, puisqu'elle active les lymphocytes T cytotoxiques, augmente les fonctions des lymphocytes T NK et agit sur les lymphocytes B (producteurs d'anticorps) (3, 180).

Les cytokines offrent donc des potentialités thérapeutiques réelles, mais il est nécessaire de mieux comprendre leur rôle *in vivo*. Jusqu'à présent, des études évaluant l'une d'entre elles, l'IL-2, ont été plutôt encourageantes. D'autres essais sont actuellement en cours pour confirmer ces résultats et déterminer l'intérêt de ce type de traitement sur l'évolution clinique de l'infection (180).

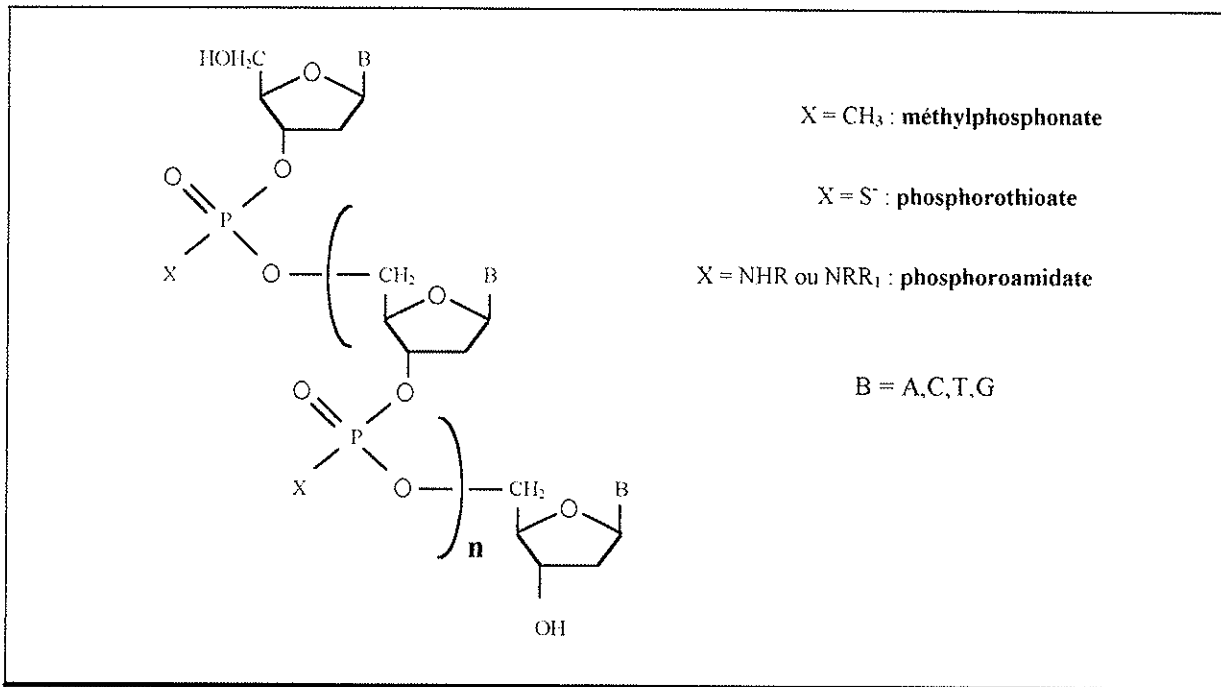


Figure 30 : structure générale des oligonucléotides antisens (129).

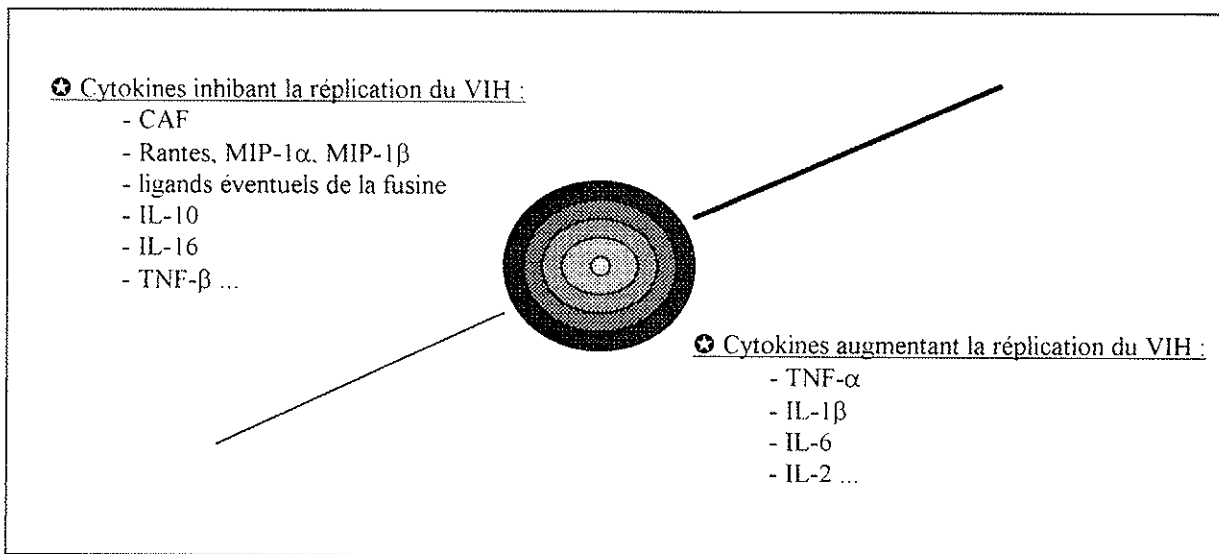


Figure 31 : les cytokines et la réplication du VIH *in vitro* (14).

TROISIEME PARTIE
TRAVAIL EXPERIMENTAL

Nous ne reviendrons pas sur l'intérêt d'avoir recours à des méthodes permettant une présélection *in vitro* de composés à visée anti-VIH tant la quantité de molécules produites chaque année est importante. Au cours de notre travail, nous avons évalué l'activité antivirale de molécules originales, *in vitro*, vis-à-vis du virus VISNA-MAEDI sur culture de cellules en microplaques, à l'aide d'une méthode colorimétrique simple et rapide utilisant un sel de tétrazolium et mesurant la viabilité de cellules infectées par le virus. Le système cellulaire est constitué de cellules fibroblastiques primaires de plexus choroïdes de mouton permissives au virus VISNA-MAEDI.

Dans un premier temps, nous présentons les matériels et méthodes employés durant nos manipulations, puis nous exposons et discutons les résultats de nos expérimentations.

CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES

Les différents réactifs et produits biologiques utilisés lors de nos manipulations constituent d'excellents milieux de culture pour de nombreux micro-organismes (bactéries, champignons). Il est donc indispensable de travailler le plus proprement possible afin de ne permettre aucune contamination par des germes présents dans l'air ambiant ou apportés par les manipulateurs.

Ainsi, nous avons réalisé nos travaux en atmosphère stérile sous hotte à flux laminaire vertical (ADS France) en utilisant du matériel préalablement stérilisé, des réactifs stériles, et en respectant les conditions de travail nécessaires pour ce genre de travaux.

I - CULTURE CELLULAIRE :

I.1. Nature et origine des cellules :

Les cellules utilisées comme support pour la culture du virus VISNA-MAEDI sont des **cellules fibroblastiques primaires** ; elles sont issues de plexus choroïde de mouton, membranes richement vascularisées situées au niveau des deux ventricules cérébraux.

Ces cellules primaires ont été choisies pour deux raisons essentielles :

⇒ d'une part, le virus VISNA présente un tropisme pour le système nerveux central et pour les plexus choroïdes en particulier. La culture *in vitro* de ces cellules permet ainsi de reconstituer un environnement cellulaire proche des conditions naturelles.

⇒ d'autre part, ces cellules une fois infectées, produisent un titre élevé de virus.

Une autre particularité des fibroblastes est leur capacité, contrairement à beaucoup d'autres types cellulaires, à conserver leur morphologie en culture. Au microscope optique inversé (NIKON), les cellules

apparaissent mononucléées, fusiformes, avec des prolongements cellulaires caractéristiques, et leur richesse en organites cytoplasmiques témoigne de leur grande activité métabolique.

1.2. Entretien des cultures :

Les cellules de PC sont entretenues à l'étuve (JOUAN IG150) à +37°C, sous 5% de CO₂ en atmosphère humide. Ce sont des cellules fragiles, à durée de vie limitée.

1.2.1. Le milieu de culture :

Le milieu de culture est le **DMEM**, **milieu nutritif de base**, auquel est ajouté 10% de sérum de veau foetal (SEROMED* Biochrom KG).

Le DMEM est reconstitué à partir des produits suivants :

| | |
|--|--------|
| - MEM (SIGMA) ----- | 9,7 g |
| - eau distillée ----- | 890 ml |
| - HEPES (SIGMA) ----- | 4,76 g |
| - bicarbonate de sodium (SIGMA) ----- | 1 g |
| - acides aminés non essentiels (SIGMA) ----- | 10 ml |
| - hydroxyde de sodium 1 N ----- | 6 ml |

Ces différents composants sont mélangés à l'aide d'un agitateur magnétique à barreau. La solution obtenue, ajustée à un pH de 7,4, est filtrée stérilement (Sterivex - GV, MILLIPORE) et répartie dans des flacons stériles. Le pH de la préparation finale après filtration est de 7,2 et le DMEM est conservé au réfrigérateur à +4°C.

La concentration assez élevée de sérum de veau foetal (SVF), s'explique par le fait que les fibroblastes, compte tenu de leur importante activité mitotique, exigent des facteurs mitogènes.

Le milieu de culture doit être changé régulièrement, tous les 2 ou 3 jours.

I. 2. 2. Le repiquage :

Les cellules fibroblastiques, issues des explants de PC, sont des **cellules adhérentes**, qui ont la propriété de s'étaler en monocouche sur la paroi du flacon de culture (CORNING USA) (figure 32).

Il faut éviter de maintenir la culture à pleine confluence (figure 33) ; dans le cas contraire, les cellules vont se chevaucher, réduisant la surface d'échange avec le milieu, et dépérir. Dès que les cellules recouvrent la totalité du support qui leur est offert, le repiquage devient nécessaire et constitue une étape essentielle dans l'entretien de la culture cellulaire.

Ce repiquage se fait en moyenne tous les 4 jours. Les cellules de PC peuvent théoriquement subir une quinzaine de passages, mais ce nombre varie avec l'explant ; pour que les conditions de viabilité cellulaire soient maximales, nous nous limitons au laboratoire à 8 générations de subcultures.

I. 2. 2. 1. La trypsination :

C'est l'étape de **détachement des cellules** de leur support. Dans un premier temps, le flacon est vidé de son milieu de culture. Le tapis cellulaire est ensuite rincé avec 2 ml **d'une solution saline de trypsine à 0,05% (p/v) et d'EDTA disodique à 0,02%** (SEROMED* Biochrom KG). Cette solution est isotonique et tamponnée, de pH 7,4, sans calcium ni magnésium.

Un deuxième rinçage est effectué avec 3 ml de la solution trypsine/EDTA. Environ 10% de cette solution est conservée, de façon à recouvrir le tapis cellulaire d'un léger film. L'ensemble est incubé à +37°C pendant quelques minutes (en général 3 et jamais plus de 10). A la sortie de l'étuve, le fait de taper avec la main sur les parois du flacon peut faciliter le détachement cellulaire. Ce détachement est observé au microscope optique inversé.

Lorsque le tapis cellulaire est détaché, on ajoute 5 ml de milieu de culture, et les cellules sont dispersées par aspirations et refoulements successifs.

I. 2. 2. 2. La remise en culture :

On effectue tout d'abord un comptage des cellules de PC. Pour cela, une goutte de suspension cellulaire est déposée sur une cellule de Malassez (PRECISS France). Cette suspension cellulaire est ensuite dédoublée

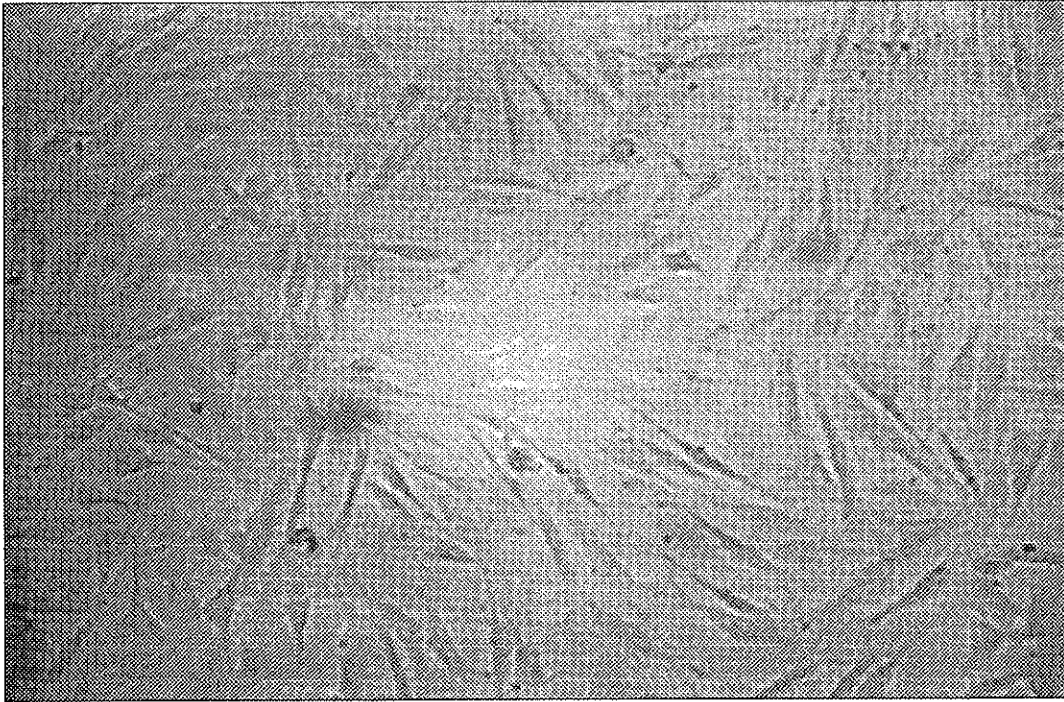


Figure 32 : culture de fibroblastes de PC au microscope optique (x 10) : les cellules adhèrent à la paroi du flacon de culture et forment une couche monocellulaire (23).

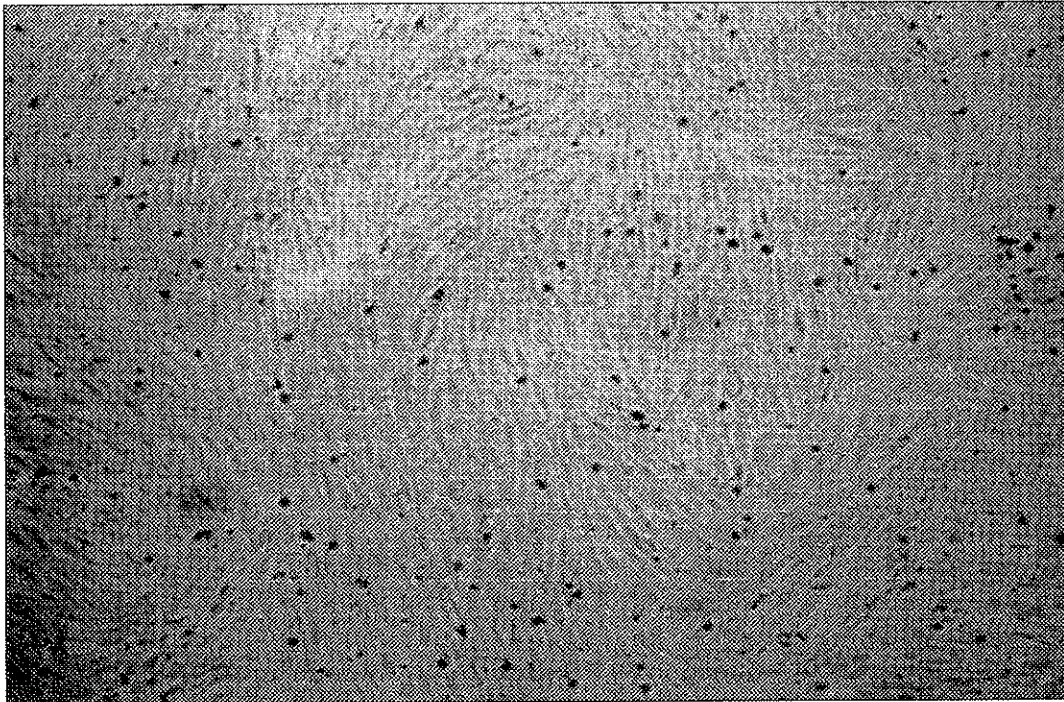


Figure 33 : culture de fibroblastes de PC au microscope optique (x 4) : tapis cellulaire à pleine confluence (23).

voire détripée et répartie dans des boîtes de culture aux dimensions appropriées. Dans chaque boîte, du milieu de culture avec 10% de SVF (qui va de plus inhiber l'activité enzymatique de la trypsine) est rajouté. L'incubation se fait à +37°C.

A partir du moment où les cellules adhèrent à nouveau, c'est-à-dire dans les 24 heures qui suivent, le milieu peut être changé.

I . 3 . Congélation - Décongélation :

I . 3 . 1 . Congélation :

Après quelques subcultures, on dispose d'une quantité suffisante de cellules ; celles-ci peuvent être congelées et constituer ainsi une réserve.

Les cellules, une fois trypsinées, sont mises en suspension dans un milieu de culture (DMEM) contenant 10% de SVF et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (SDS, Peypin, France). La concentration cellulaire doit être de 1 à $1,5 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Cette suspension est répartie dans des cryotubes (environ 1,5 ml par tube). Ceux-ci sont alors placés à -70°C dans un récipient permettant une chute de température progressive, avant d'être conservés dans de l'azote liquide à -196°C.

I . 3 . 2 . Décongélation :

La suspension cellulaire doit être rapidement décongelée. Pour cela, les cryotubes sont placés dans un bain-marie à +37°C.

Le contenu d'un tube est vidé dans une petite boîte de culture de 25 cm² (ou deux tubes dans une boîte moyenne de 75 cm²).

Du milieu de culture, DMEM et 10% de SVF, est rajouté afin d'obtenir un volume final suffisant.

L'incubation à +37°C est de 24 heures avant un changement de milieu.

II - LE VIRUS VISNA-MAEDI :

II.1 . Origine :

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé deux souches virales :

- **la souche VISNA K796**, souche de référence, fournie par le Laboratoire Central Vétérinaire de Maisons-Alfort. En 1960, SIGURDSSON l'a isolée d'un mouton atteint d'encéphalite.

- **la souche MAEDI WLCl**, d'origine américaine, également fournie par le Laboratoire Central de Maisons-Alfort, et isolée par CUTLIP à partir d'un mouton atteint de pneumonie progressive.

Ces deux souches sont conservées au congélateur, à -70°C, sous forme d'aliquotes de surnageants de cultures cellulaires infectées.

II.2 . Constitution du pool viral :

Elle se fait à partir d'un tapis de cellules de PC arrivé à 80% de la confluence.

Dans un premier temps, le flacon est vidé de son milieu de culture et rincé avec le **milieu de base** (DMEM) afin d'éliminer le sérum de veau foetal qui inhibe le développement du virus.

On ajoute ensuite un volume de 2 ml de surnageant de culture infectée par le virus, pour un tapis cellulaire de 75 cm² (0,5 à 1 ml pour un tapis de 25 cm²).

Après un temps d'incubation d'une heure à 37°C, le surnageant est rejeté et remplacé par 10 ml de **milieu de survie** (DMEM et 2% de SVF) dans le cas d'un flacon de 75 cm² (5 ml s'il s'agit d'un flacon de 25 cm²).

L'incubation à 37°C est prolongée jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) ; le surnageant est récolté puis centrifugé (JOUAN CR312) pendant 10 minutes, à 1600 tours/minute et à +4°C, de façon à éliminer les débris cellulaires en suspension. Il est alors congelé à -70°C.

Du milieu de survie (10 ou 5 ml) est réintroduit dans le flacon.

Cette dernière opération est répétée jusqu'à épuisement du tapis cellulaire, qui se produit généralement en une dizaine de jours.

II. 3 . Titrage du virus :

II. 3 . 1 . Principe :

Déterminer le titre infectueux d'une suspension virale signifie dénombrer, par unité de volume, les particules virales capables d'infecter des cellules permissives.

Le virus est titré selon une microméthode mise au point par LARROUTUROU (111) et basée sur l'effet cytopathique caractéristique du virus VISNA-MAEDI.

II. 3 . 2 . Protocole :

Après trypsination d'un tapis cellulaire à confluence, les cellules sont dénombrées sur cellule de Malassez; la **suspension cellulaire** est alors ajustée à 2.10^5 cellules/ml avec du DMEM additionné de 5% de SVF. 50 µl de la suspension finale sont disposés dans chacune des cupules d'une plaque de 96 puits à fond plat (FALCON, Becton Dickinson Labware. USA).

Des **dilutions décimales du virus à titrer** sont préparées dans du milieu de base en suivant une progression géométrique de raison 10 et en changeant de pipette à chaque dilution. 50µl de chacune d'elles sont disposés dans une série de 8 cupules, contenant déjà les cellules. Deux séries de puits sont réservées : l'une au témoin cellules (cellules non infectées additionnées de 50 µl de milieu nutritif dans chaque puits), l'autre au virus non dilué.

La **concentration cellulaire finale est de 10^4 cellules/puits**. Le pourcentage en SVF est de 2,5%, ce qui est suffisant pour assurer l'adhérence et la croissance des cellules dans la plaque, sans toutefois ralentir le développement du virus.

Avant d'être portée à l'étuve, la microplaque est recouverte d'un film plastique adhésif. Ceci est destiné à prévenir l'évaporation du contenu des puits et à éviter une éventuelle contamination microbienne entre les puits.

Le temps d'incubation est fixé à 6 jours (temps nécessaire pour obtenir un titre viral maximal) à une température de 37°C et sous 5% de CO₂. Passé ce délai, les surnageants sont éliminés par aspiration.

Afin de mieux apprécier l'ECP viro-induit au microscope inversé, on effectue **une coloration au May-Grünwald/Giemsa (MGG)** de la façon suivante :

- mettre 100 µl de réactif May-Grünwald (MERK) dans chacun des puits de la microplaque, replacer le couvercle pour éviter toute évaporation et attendre 3 minutes,
- jeter le contenu des puits et rincer à l'eau courante,
- introduire ensuite dans chaque puits 100 µl de réactif de Giemsa (Société chimique POINTET GIRARD, France) dilué au 1/20 dans l'eau et laisser en contact durant au minimum 30 minutes,
- enfin, jeter le contenu de la microplaque et rincer à l'eau courante.

Après coloration, la plaque est observée au microscope inversé. Le nombre de cupules positives (+), c'est-à-dire présentant au moins un **syncytium**, est évalué, en prenant comme référence négative le témoin cellules.

Le **titre infectieux** du virus est ensuite calculé par la technique des dilutions limites selon la méthode de REED et MUENCH (méthode permettant d'augmenter artificiellement le nombre d'essais par dilution en utilisant le procédé des totaux cumulatifs)(146, 6). Il est exprimé en dose infectante à 50% en culture tissulaire (DICT 50 ou TCID 50 en anglais) par millilitre. Cette **DICT 50** est calculée selon une formule statistique, après avoir déterminé les dilutions encadrant le point d'infection 50% :

$$\text{DICT 50} = 10^{- \left[- \log \text{dil. sup} + \frac{\% \text{ dil. sup. à 50\%} - 50\%}{\% \text{ dil. sup. à 50\%} - \% \text{ dil. inf. à 50\%}} \right]}$$

- où
- **dil. sup.** correspond à la dilution supérieure au point 50%
 - **% dil. sup. à 50%** correspond au pourcentage de réponses positives cumulées, pour la dilution supérieure au point 50%.
 - **% dil. inf. à 50%** correspond au pourcentage de réponses positives cumulées, pour la dilution inférieure au point 50%.

III - LE MTT :

Au cours de notre travail expérimental, nous avons évalué l'activité antivirale de molécules originales à partir d'un test colorimétrique utilisant le MTT.

III . 1 . Structure : (figure 34)

Le sel de tétrazolium MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium est un composé organique dont la structure dérive de celle des tétrazoles (169).

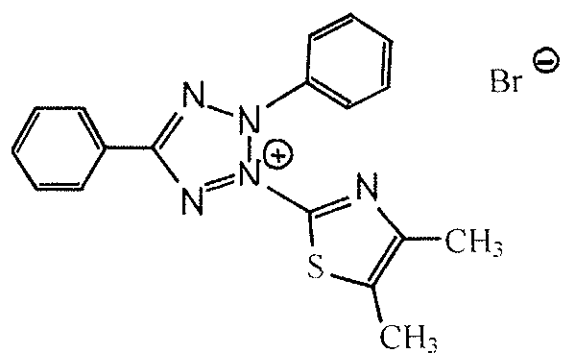
Cette structure se caractérise par un noyau insaturé à cinq sommets, composé d'un carbone et de quatre atomes d'azote dont un quaternaire chargé positivement.

III . 2 . Propriétés physico-chimiques :

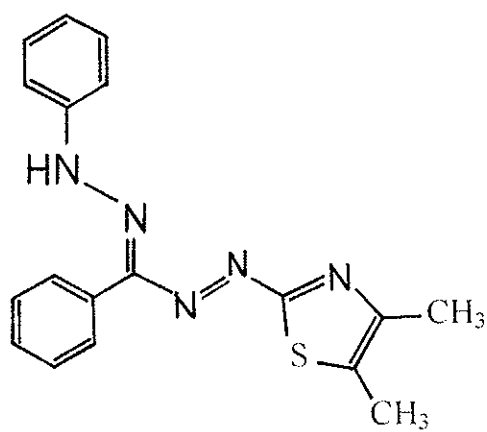
II . 2 . 1 . Propriétés physiques :

Le **MTT** se présente sous la forme d'une poudre **jaune** soluble dans l'eau. Il est sensible aux acides, à la lumière et à l'humidité ; il est donc conservé dans un récipient hermétique et opaque, à une température comprise entre 0 et +5°C.

De par sa structure chimique à doubles liaisons conjuguées, il absorbe fortement dans l'ultra-violet (UV) ; cependant cette propriété optique n'a trouvé jusqu'à présent, aucune application.



MTT



formazan

Figure 34 : structures chimiques du MTT et de son formazan (145).

III. 2. 2. Propriétés chimiques :

La réduction du MTT provoque une ouverture du cycle tétrazolique : le produit de la réaction est un composé neutre, coloré en **bleu-violet**, appelé **formazan** (169) (figure 34).

Le formazan est insoluble dans l'eau et facilement soluble dans les solvants organiques et les lipides.

III. 3. Principe de la méthode colorimétrique au MTT :

Le MTT, composé organique coloré en jaune, est réduit dans les **cellules métaboliquement actives**, donc vivantes, par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé cristallisé bleu-violet : le formazan. Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption, caractérisé dès lors par une bande d'absorption dans le visible, et deux bandes dans l'UV.

Les cristaux violets de formazan, insolubles dans l'eau, sont alors solubilisés dans un solvant organique approprié qui stoppe, de plus, la réaction colorée. La solution ainsi formée, est analysée spectrophotométriquement. **L'absorbance lue est proportionnelle à la quantité de formazan produite, elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes** (56).

III. 4. Avantages de la méthode colorimétrique au MTT :

Les principaux avantages de la méthode au MTT sont :

- sa **simplicité** de mise en oeuvre,
- sa **sécurité** puisqu'elle ne fait intervenir aucun isotope radioactif. Cependant le manipulateur doit savoir que le MTT est une substance toxique dont l'inhalation, l'ingestion ou même le contact avec la peau, peuvent être dangereux,
- sa capacité à être **automatisée** grâce à des pipettes multicanaux, des diluteurs, des distributeurs contrôlés par microprocesseur (145) et des lecteurs de densités optiques (DO) reliés à un système informatique (113),

→ son **adaptabilité**. Elle est très souvent rencontrée en cancérologie et en immunologie, aussi bien dans des tests de prolifération, que d'activation ou de cytotoxicité cellulaire.

→ enfin et surtout la **rapidité** et la facilité de la lecture des résultats qui est effectuée automatiquement grâce à un lecteur spectrophotométrique pour microplaque.

IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU

MTT : (figure 35)

IV . 1 . Les cellules :

Après trypsination, les cellules adhérentes cultivées dans un flacon de 75 cm² sont ajustées à 2.10^5 cellules/ml dans du milieu de base additionné de SVF. Ce SVF doit permettre la survie de la culture cellulaire tout en évitant l'inhibition du virus ; c'est pourquoi on l'emploie à une concentration finale de 5%.

100 µl de suspension cellulaire sont ensuite distribués dans une microplaque de 96 puits à fond plat. Les 8 puits de la dernière colonne ne sont pas remplis ; il représenteront les blancs lors de la lecture des densités optiques.

IV . 2 . Les molécules :

Ce sont des **molécules originales**, fournies d'une part par le laboratoire de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de Limoges, il s'agit dans ce cas de trois dérivés analogues de nucléoside de type 3-alkyl 2-pipérazinone ; d'autre part par le laboratoire de Chimie Organique du Professeur Buxeraud de la Faculté de Pharmacie de Limoges avec le 6-méthoxy 5-amino benzotriazole et le 6-méthoxy 5-amino 2-méthylbenzimidazole (figure 36). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec la ddC.

Chaque molécule à tester se présente sous la forme d'une poudre qu'il faut solubiliser dans un solvant approprié (tableau 11) de façon à obtenir une concentration initiale généralement de l'ordre de 2 à 5.10^{-3} mole/l. La solution ainsi préparée, est filtrée stérilement sur membrane de porosité 0,22 µm (MILLEX GV) puis conservée par précaution à l'abri de la lumière et de la chaleur.

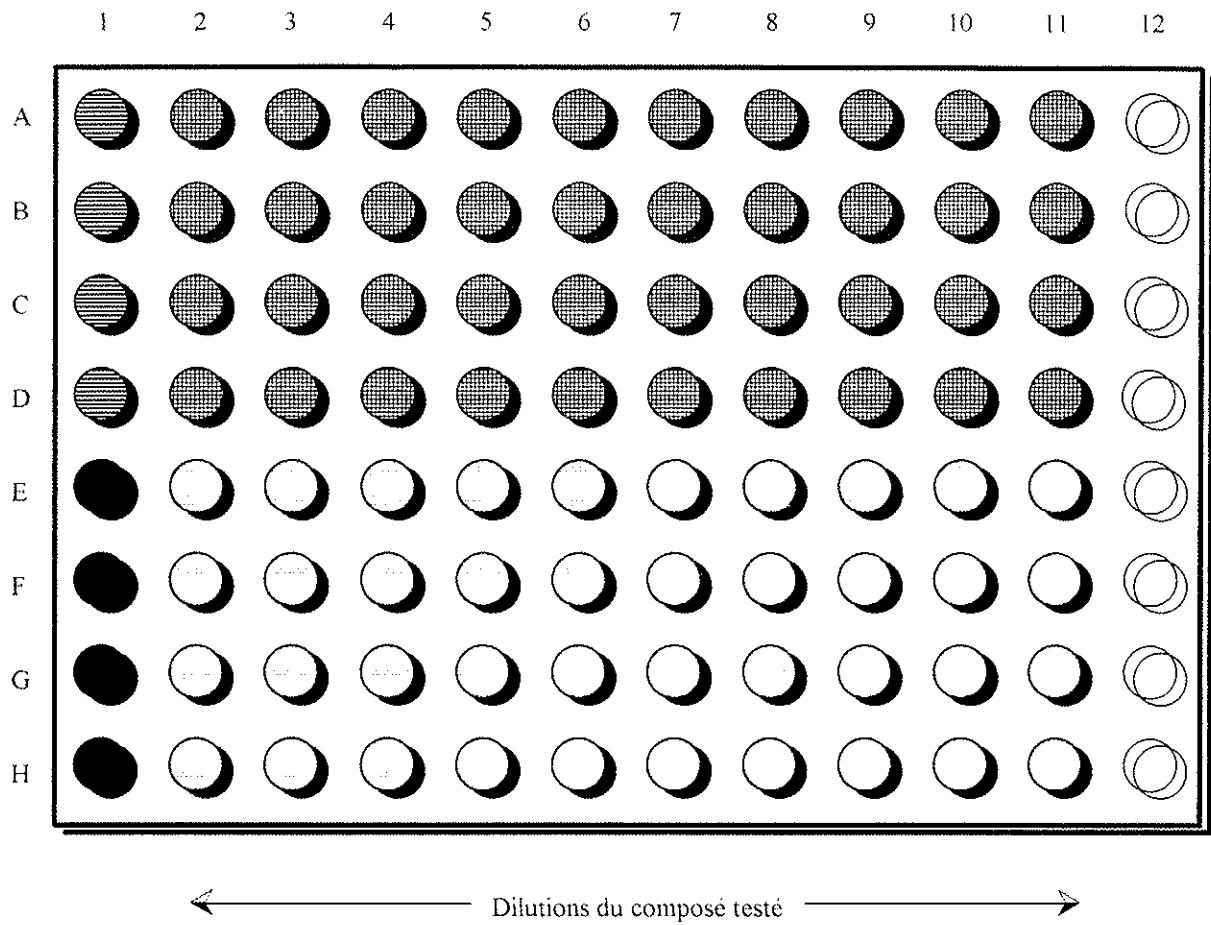
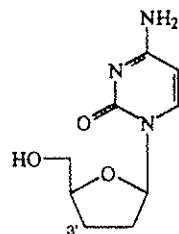
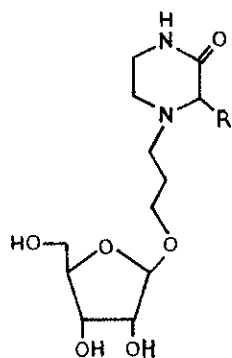


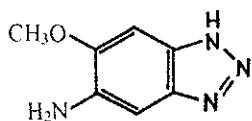
Figure 35 : organisation de la microplaque de 96 puits à fond plat pour l'évaluation de l'activité antivirale.

2',3'-didésoxycytidine (**ddC**)

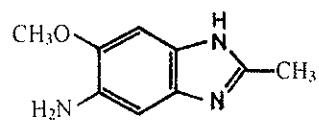
R = C₈H₁₇ : N¹-(3-β-D ribofuranoxypropyl)-3-octylpipérazine-2-one (**AB 112**)

R = C₁₀H₂₁ : N¹-(3-β-D ribofuranoxypropyl)-3-décylpipérazine-2-one (**AB 86**)

R = C₁₂H₂₅ : N¹-(3-β-D ribofuranoxypropyl)-3-dodécylpipérazine-2-one (**AB 113**)



6-méthoxy-5-aminobenzotriazole
(**R1**)



6-méthoxy-5-amino-2-méthylbenzimidazole
(**R2**)

Figure 36 : structures chimiques des molécules testées.

| MOLECULES | PM | SOLVANT | [SOL.MERE] | CONCENTRATIONS FINALES | RAISON DILUTION |
|-----------|-------|-------------|------------|--|-----------------|
| DDC | 211,2 | EAU STERILE | 5 mM | 833,33 → 1,63 µM (714,29 → 1,39 µM) | 2 |
| AB 112 | 402 | EAU STERILE | 3 mM | 500 → 0,98 µM (428,57 → 0,84 µM) | 2 |
| AB 86 | 430 | | 5 mM | 220 → 10,65 µM | 1,4 |
| AB 113 | 458 | | 2 mM | 200 → 5,20 µM | 1,5 |
| R1 | 164 | DMSO | 5 mM | 83,33 → 0,16 µM (71,43 → 0,14 µM) | 2 |
| R2 | 177 | | 5 mM | 83,33 → 0,16 µM (71,43 → 0,14 µM) | 2 |

PM : poids moléculaire (g/mole)
[SOL.MERE] : concentration de la solution mère
CONCENTRATIONS FINALES : concentrations moléculaires couvertes lors des essais avec le virus VISNA. Les valeurs entre parenthèses représentent les concentrations moléculaires couvertes lors des essais avec le virus MAEDI.

Tableau 11 : molécules à tester : préparation des solutions mères et de leurs dilutions.

A partir de cette solution mère, des dilutions sont préparées extemporanément dans du milieu de base en suivant une géométrie de raison variable (tableau 11).

Ainsi, 9 dilutions seront constituées pour la molécule AB112 et la DDC, la solution mère représentant la solution testée la plus fortement concentrée. En ce qui concerne les autres molécules, 10 dilutions seront fournies et permettront de réaliser l'essai. Ceci s'explique, pour les molécules R1 et R2, par l'emploi du DMSO comme solvant. Sa toxicité vis-à-vis des cellules nous contraint à réaliser une dilution au 1/10 de la solution mère dans du milieu de base.

Il est important de changer l'embout de la pipette (Pipetman, GILSON) et d'homogénéiser au Vortex (JANKE et KENKUL, IKA[®] LABORTECHNIK) après chaque dilution.

25 µl de chaque dilution sont ensuite déposés dans les 8 puits d'une colonne : cette manipulation débute par l'avant-dernière colonne (qui est remplie de la plus forte dilution) et se termine par la deuxième colonne (remplie de la solution la plus fortement concentrée).

IV . 3 . Le virus :

IV . 3 . 1 . Souche VISNA K 796 :

La multiplicité d'infection devant être de 0,5 DICT 50 par cellule, le pool de départ est dilué au 1/8. Le volume de suspension virale nécessaire est alors de 25 µl pour chaque puits à infecter, c'est-à-dire tous les puits de la moitié inférieure de la plaque.

IV . 3 . 2 . Souche MAEDI WLC1 :

Pour obtenir une multiplicité d'infection de 0,5 DICT 50 par cellule, le volume de suspension virale pure nécessaire pour infecter chaque puits devrait être de 30 µl. Cependant suite aux essais menés avec différents volumes de suspension (de 20 à 75 µl), la valeur de 30 µl s'avère insuffisante et doit être réajustée à 50 µl.

IV . 4 . Incubation :

Après avoir complété le volume de tous les puits à 150 µl pour le virus VISNA et à 175 µl pour le virus MAEDI avec du DMEM, la microplaque est protégée par un film plastique puis incubée pendant respectivement **5 et 9 jours** à +37°C et sous 5% de CO₂.

IV . 5 . Coloration par la méthode au MTT :

IV . 5 . 1 . Préparation de la solution de MTT :

Le MTT (SIGMA chimie) est dissous dans du tampon phosphate (PBS) (BIOMERIEUX SA. France) de façon à obtenir une concentration de **6mg/ml**.

La solution jaune obtenue est filtrée stérilement (MILLEX GV) ce qui permet d'éliminer la petite quantité de résidu insoluble présent dans certains lots de MTT. Elle peut être conservée pendant un mois à condition d'être tenue à l'abri de la lumière et de la chaleur (+4°C).

IV . 5 . 2 . Mode opératoire :

25 µl de MTT sont distribués dans chaque puits (exception faite des blancs) à l'aide d'une Finnpipette (Finnpipette Stepette, LAB SYSTEMS, Finlande).

La plaque est alors **incubée** à +37°C pendant trois heures. Au cours de ce temps, les cellules vivantes réduisent le sel de tétrazolium en son formazan.

Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration avec une pipette multicanaux en prenant soin de ne pas endommager le tapis cellulaire.

Le solvant alors utilisé pour dissoudre les cristaux violets de formazan est le **DMSO** (40) ajouté dans les 96 puits à raison de 100 µl/puits. Cette addition est suivie d'une étape d'agitation mécanique (Fressinet, France) pendant 20 minutes et à l'abri de la lumière.

IV . 6 . Lecture des densités optiques :

Celle-ci doit être faite rapidement après l'agitation des plaques, à l'aide d'un lecteur ELISA (85).

Le formazan présente des caractéristiques spectrales variables selon la nature du solvant utilisé. Le formazan provenant de la métabolisation du MTT par les cellules vivantes, et dissous dans le DMSO, absorbe au maximum entre 540 et 570 nm (5, 151). La lecture des DO se fait donc à une longueur d'onde de **540 nm**, en utilisant comme blancs les huit puits de la plaque ne contenant que du DMSO.

IV . 7 . Détermination de la cytotoxicité des molécules testées :

Elle se fait en calculant le **pourcentage de viabilité des cellules non infectées au contact de la substance à tester** par rapport au témoin cellules, selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{DO (cell. + mol.)}}{\text{DO (cell.)}} \times 100$$

- où
- DO (cell. + mol.) représente la DO moyenne calculée pour les cellules non infectées au contact de la molécule testée.
 - DO (cell.) représente la DO moyenne calculée pour le témoin cellules (cellules non traitées et non infectées).

Les essais étant répliqués quatre fois par microplaque, les DO moyennes sont obtenues en faisant la moyenne des quatre DO lues pour chaque dilution de substance.

Les pourcentages de viabilité ainsi calculés pour chacune des concentrations de la molécule, sont alors représentés graphiquement.

La concentration cytotoxique 50 (CC 50) est définie comme la concentration de la molécule testée qui abaisse de 50% le nombre de cellules viables par rapport au témoin cellules. Sa valeur est déterminée à partir de l'équation de la droite de régression linéaire.

IV . 8 . Détermination de l'activité antivirale des molécules testées :

Elle se fait en calculant le **pourcentage de viabilité des cellules infectées traitées**, par rapport au témoin cellules selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)}}{\text{DO (cell.)}} \times 100$$

- où
- DO (cell. + mol. + virus) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées infectées.
 - DO (cell.) représente la DO moyenne calculée pour le témoin cellules.

Les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus pour chacune des dilutions permettent d'établir une sigmoïde effet-dose reflétant l'efficacité du composé testé.

On déterminera également le **pourcentage de protection cellulaire** relatif à chaque dilution et calculé selon la formule proposée par PAUWELS (145) :

$$\% \text{ de protection cellulaire} = \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)} - \text{DO (cell. + virus)}}{\text{DO (cell.)} - \text{DO (cell. + virus)}} \times 100$$

La représentation graphique du pourcentage de protection cellulaire en fonction de la dose, permet de déterminer à partir de la droite de régression linéaire, la concentration conférant 50% de protection : on parle de **concentration inhibitrice 50 ou de CI 50**. Cette CI 50 permet ainsi d'exprimer l'activité antivirale de la molécule.

Selon certains auteurs, cette formule ne tient pas compte de l'effet indépendant de la drogue sur les cellules, qu'il soit activateur ou inhibiteur (8). Une autre formule du pourcentage de protection a donc été proposée, mais n'a pas été utilisée pour nos expérimentations :

$$\% \text{ de protection cellulaire} = \left[1 - \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)} - \text{DO (cell. + mol.)}}{\text{DO (cell.)} - \text{DO (cell. + virus)}} \right] \times 100$$

- où
- DO (cell. + mol. + virus) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées infectées,
 - DO (cell. + mol.) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées mais non infectées,
 - DO (cell.) et DO (cell. + virus) représentent les DO moyennes calculées respectivement pour le témoin cellules et le témoin virus.

CHAPITRE SECOND : RESULTATS

Au cours de notre travail expérimental, nous nous sommes donc intéressés à deux séries de molécules originales en vue de déterminer leur éventuelle activité antirétrovirale sur le virus VISNA-MAEDI. La ddC a également été testée et nous servira de molécule de référence.

I - CULTURE DU VIRUS :

I . 1 . Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP) :

Lorsque le virus se développe dans les cellules de PC, il entraîne des modifications morphologiques typiques visibles au microscope optique inversé.

Ces changements apparaissent dès le troisième jour après la contamination des cellules *in vitro*. On observe d'abord des cellules réfringentes, volumineuses, multinucléées, qui prennent ensuite une forme étoilée avec de nombreux prolongements filiformes : on parle alors de **syncytia**, qui peuvent présenter jusqu'à 20 noyaux disposés en "fer à cheval" et très nettement mis en évidence par la coloration au MGG. Au bout de 6 à 8 jours après l'infection, les cellules se lysent et le tapis cellulaire est détruit.

Nous avons observé que l'ECP induit par la souche MAEDI se développe moins rapidement que celui induit par la souche VISNA.

I . 2 . Résultats du titrage :

La souche VISNA présente un titre de $3,4.10^6$ DICT 50/ml.

A titre d'exemple, nous avons représenté les résultats inhérents au virus MAEDI. Le nombre de cupules positives observées au microscope inversé est rapporté dans le tableau 12. Leur nombre pour chaque dilution de virus nous

a permis de situer le point d'infection 50% et de définir, de part et d'autre de ce point, les pourcentages de réponses positives cumulées (tableau 13).

La DICT 50 a été calculée à partir de la formule énoncée dans le paragraphe II.3.2 du chapitre premier. Par cette méthode, nous avons trouvé pour le pool de virus MAEDI, une DICT 50 de $10^{-4.2}$ soit un titre de $3.17.10^5$ DICT 50/ml.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | / |
| B | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | / |
| C | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | / |
| D | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | / |
| E | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | / |
| F | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | / |
| G | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | / |
| H | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | / |

| | | | | | | | | | | |
|-------|-----------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tcell | Virus pur | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ |
| | | ← dilutions du virus → | | | | | | | | |

[-] : pas d'effet cytopathique
 [+]: apparition d'au moins 1 syncytium

| Dilutions du virus | Nombre de cupules | | Cumul des cupules | | Cupules positives cumulées | |
|--------------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|----------------------------|-------|
| | Positives | Négatives | Positives | Négatives | Taux | % |
| 10 ⁻¹ | 8 | 0 | 29 | 0 | | |
| 10 ⁻² | 8 | 0 | 21 | 0 | | |
| 10 ⁻³ | 8 | 0 | 13 | 0 | 13/13 | 100% |
| 10 ⁻⁴ | 5 | 3 | 5 | 3 | 5/8 | 62,5% |
| 10 ⁻⁵ | 0 | 8 | 0 | 11 | 0/11 | 0% |

Tableaux 12 et 13 : détermination du titre infectieux du MAEDI par la technique des dilutions limites selon la méthode de REED et MUENCH.

II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE :

L'évaluation de la cytotoxicité d'une substance est basée sur la détermination de sa CC 50, c'est-à-dire la concentration qui diminue de 50% la viabilité cellulaire par rapport aux cellules incubées seules, sans molécule.

Parmi les composés testés, quatre se sont avérés plus ou moins cytotoxiques vis-à-vis des cellules de PC aux concentrations utilisées. Il s'agit des molécules **AB 86**, **AB 113**, **R2** et **R1** qui présentent respectivement des CC 50 de 197, 156, 77 et proche de 83 μM (figures 41, 43, 49, 51, 45 et 47). Le décrochage important des courbes de viabilité des cellules traitées non infectées aux fortes concentrations pour la molécule **R1** nous permet en effet de donner une estimation de sa valeur de CC 50 bien que celle-ci ne soit pas atteinte lors de nos essais.

Les autres substances ne sont pas cytotoxiques aux concentrations utilisées ; leur CC 50 n'a pas été déterminée compte tenu des concentrations des solutions mères préparées. Nous pouvons seulement dire que leur valeur est supérieure à la plus forte concentration moléculaire testée : ainsi, la CC 50 sera considérée comme supérieure à 833 μM pour la **ddC**, et à 500 μM pour la molécule **AB 112** (figures 53, 37 et 39) (tableau 14).

III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS-A-VIS DES

SOUCHES VISNA ET MAEDI :

Pour chaque molécule, nous avons établi une représentation graphique de la viabilité des cellules infectées traitées, qui reflète l'activité antivirale (figures 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, et 53). La représentation graphique du pourcentage de protection cellulaire nous permet, quant à elle, de définir la valeur de la concentration inhibitrice 50.

Avec le virus VISNA, la molécule **AB 112** affiche une protection cellulaire aux fortes concentrations : la CI 50 est de 340 μM (figure 38). Cette protection n'a pas été retrouvée vis-à-vis de la souche MAEDI (figure 40).

Les molécules **AB 86** et **AB 113** ont été testées uniquement avec le virus VISNA : la protection augmente avec la concentration puis décroît aux valeurs les plus fortes à cause de leur cytotoxicité. Leurs CI 50 sont respectivement de 97 et 85 μM (figures 42 et 44).

La protection induite par les molécules **R1** et **R2** vis-à-vis de la souche VISNA n'apparaît qu'aux concentrations testées les plus élevées, avec des CI 50 de 54 μM pour R1 (figure 46) et 48 μM pour R2 (figure 50). En revanche, la protection vis-à-vis du virus MAEDI apparaît, au fur et à mesure que les concentrations s'élèvent, mais elle est tellement faible qu'il n'est pas possible de calculer de CI 50 (figures 48 et 52).

La **ddC** protège les cellules de l'infection par le virus VISNA à des concentrations élevées et la CI 50 est de 315 μM (figure 54). Elle n'a pas été testée sur la souche MAEDI.

Tous ces résultats sont regroupés dans le tableau 14.

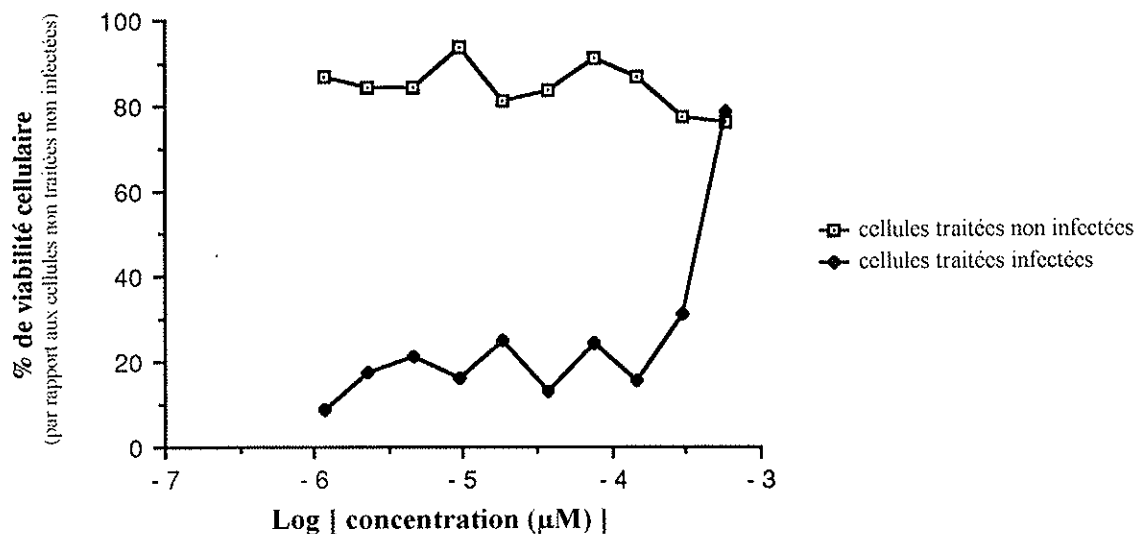


Figure 37 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule AB 112 sur les cellule de PC non infectées et infectées par le virus VISNA.

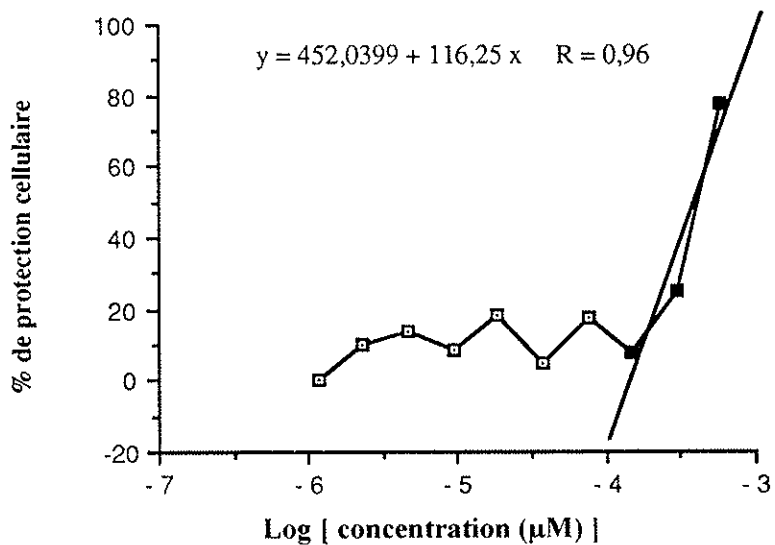


Figure 38 : activité antivirale de la molécule AB 112 sur la souche VISNA exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

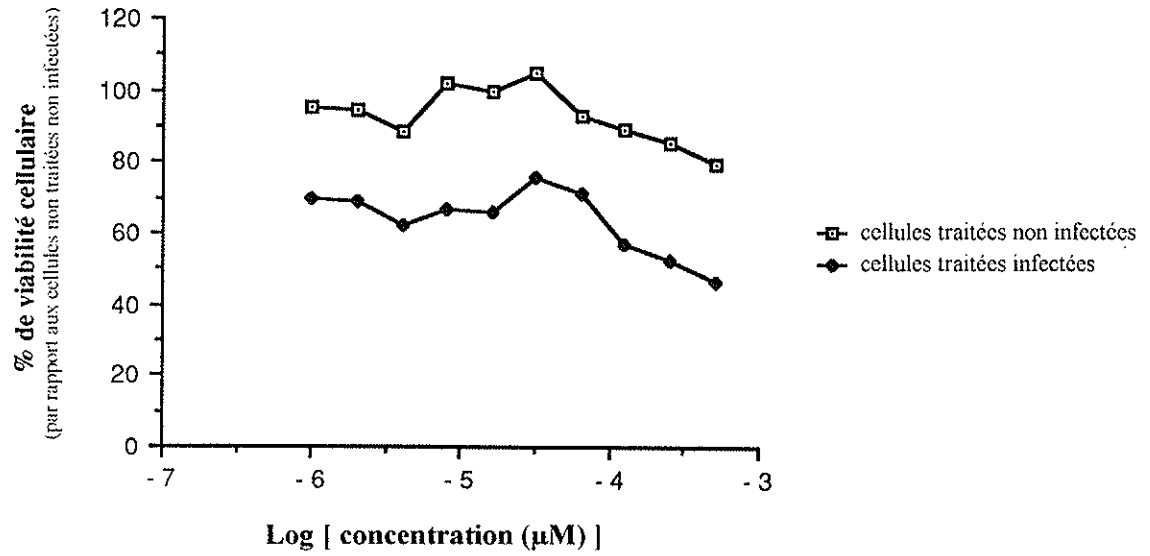


Figure 39 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule AB 112 sur les cellule de PC non infectées et infectées par le virus MAEDI.

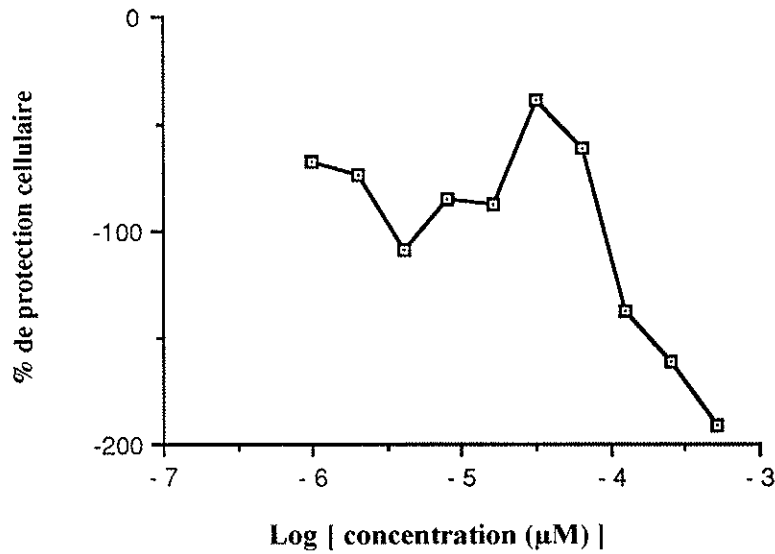


Figure 40 : activité antivirale de la molécule AB 112 sur la souche MAEDI exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

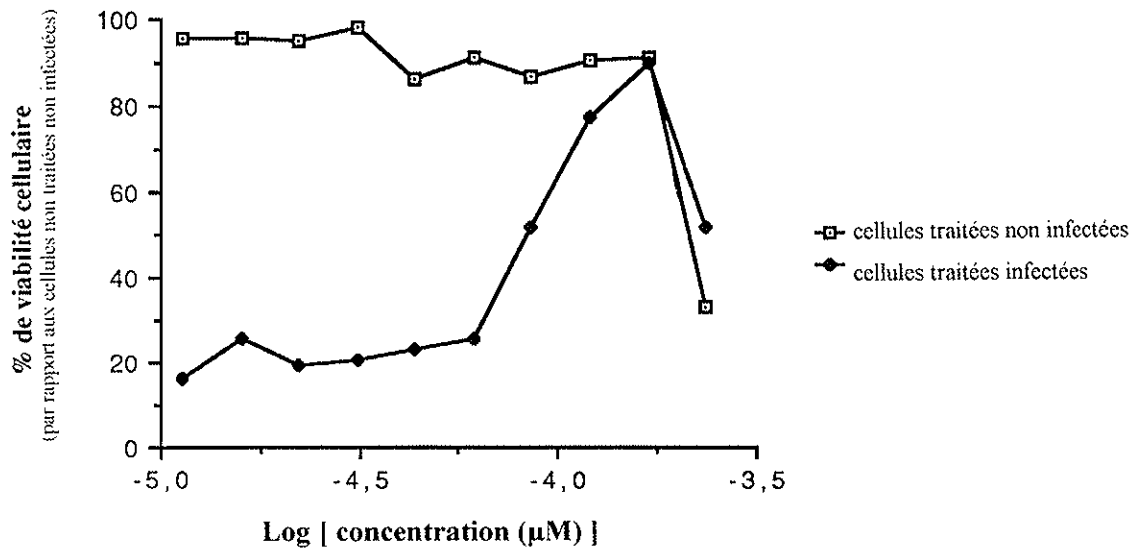


Figure 41 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule **AB 86** sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus **VISNA**.

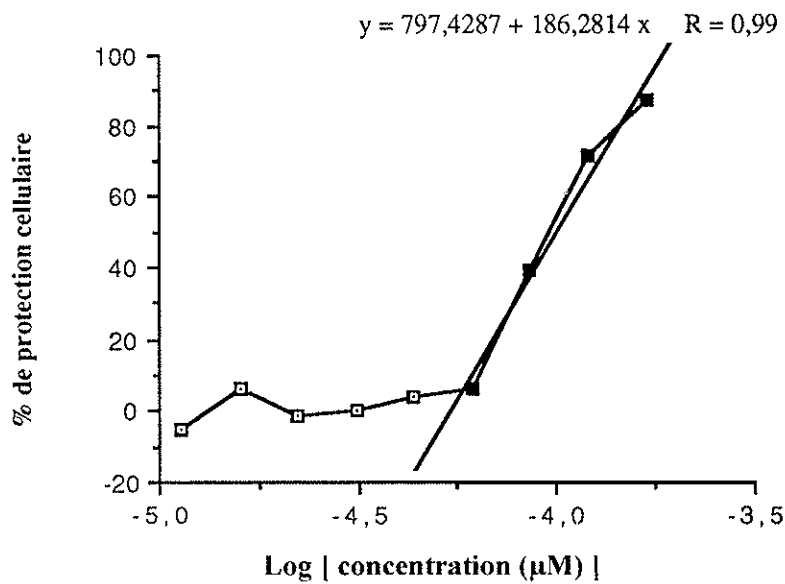


Figure 42 : activité antivirale de la molécule **AB 86** sur la souche **VISNA** exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

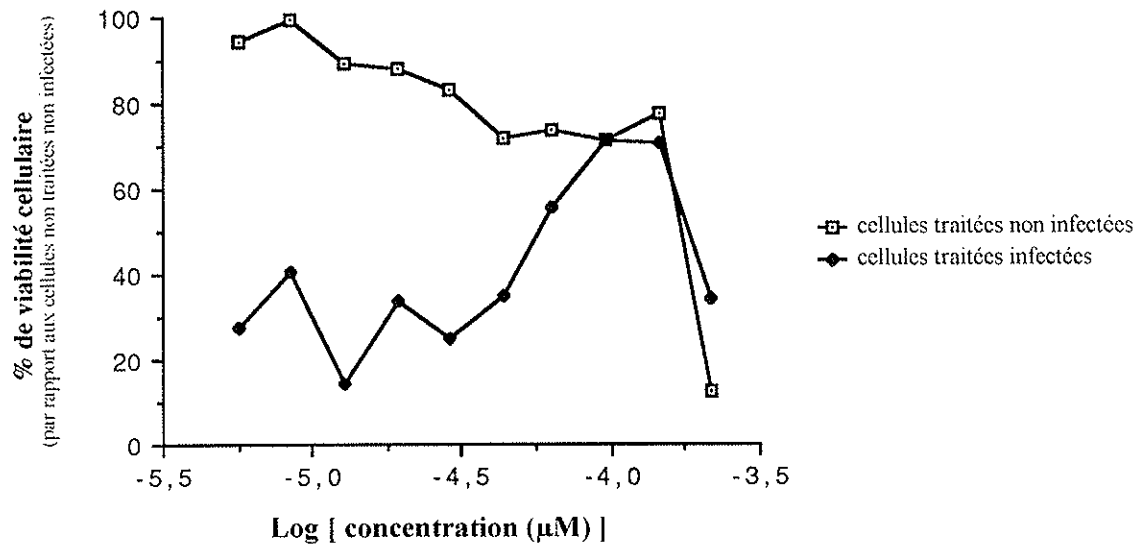


Figure 43 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule **AB 113** sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus **VISNA**.

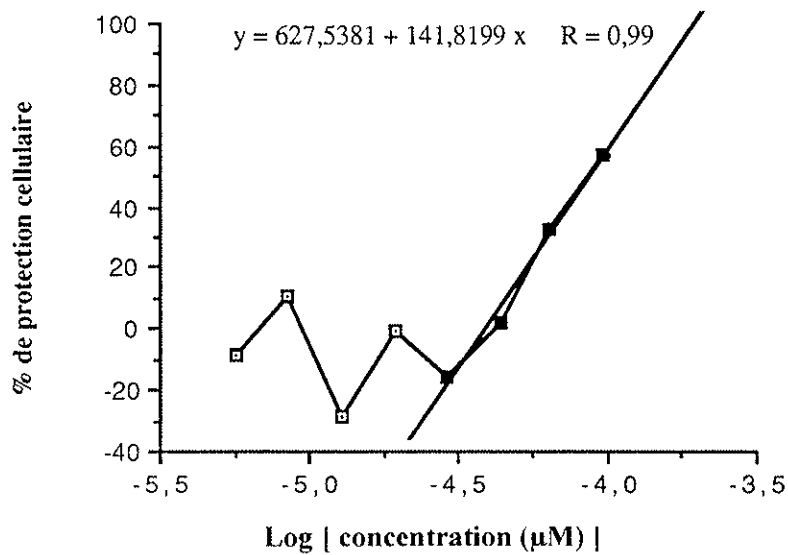


Figure 44 : activité antivirale de la molécule **AB 113** sur la souche **VISNA** exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

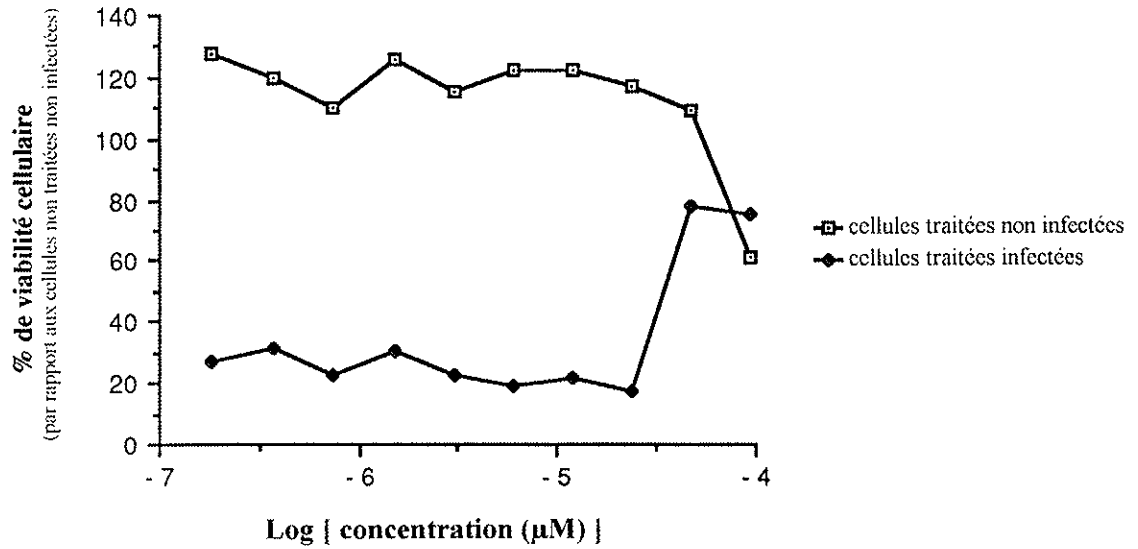


Figure 45 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule **R1** sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus **VISNA**.

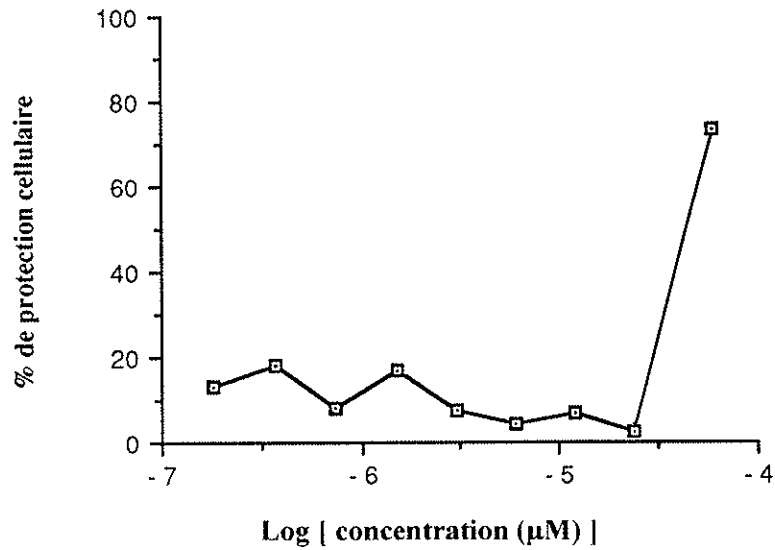


Figure 46 : activité antivirale de la molécule **R1** sur la souche **VISNA** exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

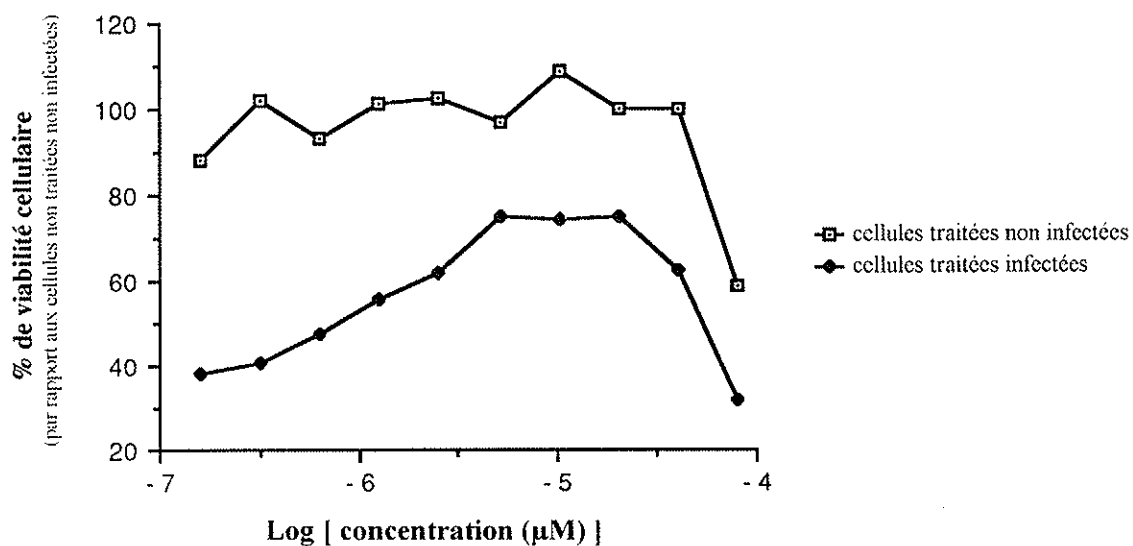


Figure 47 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule R1 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus MAEDI.

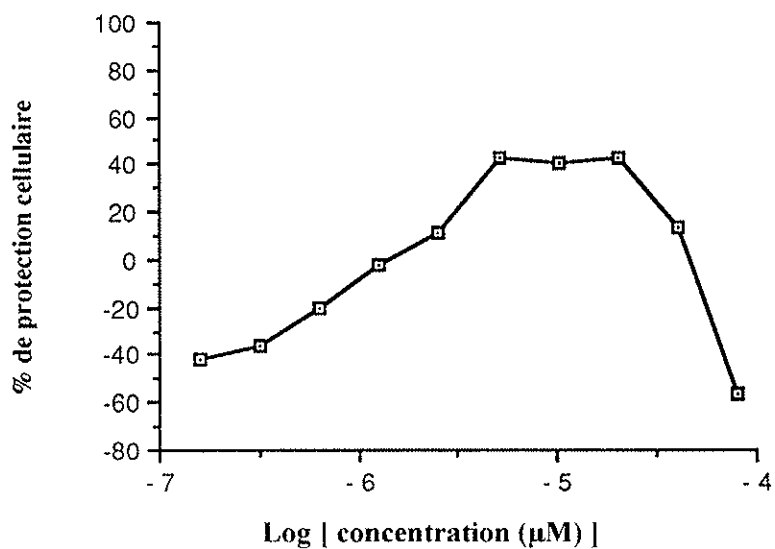


Figure 48 : activité antivirale de la molécule R1 sur la souche MAEDI exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

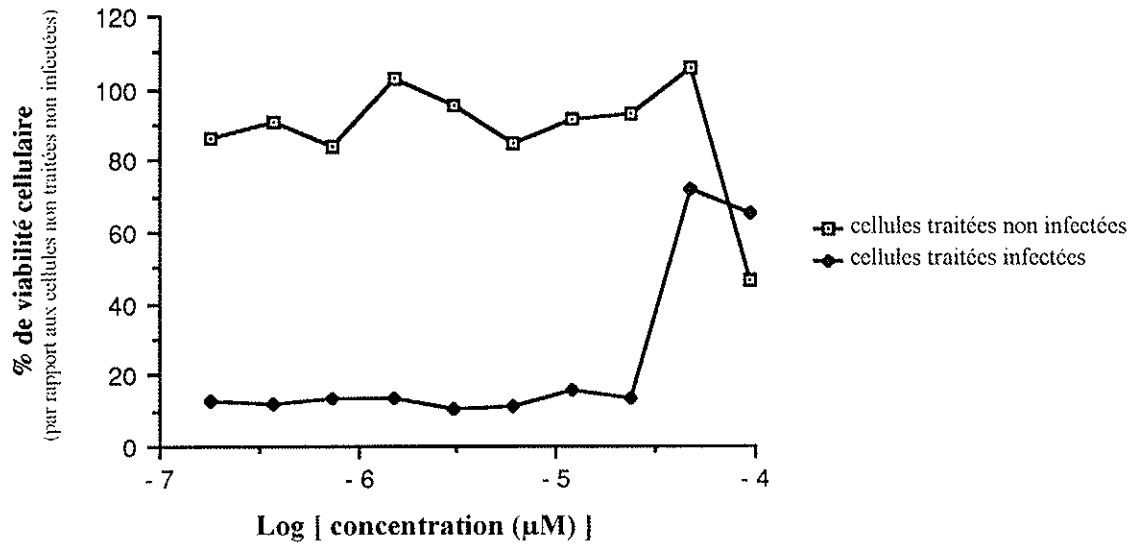


Figure 49 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule R2 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA.

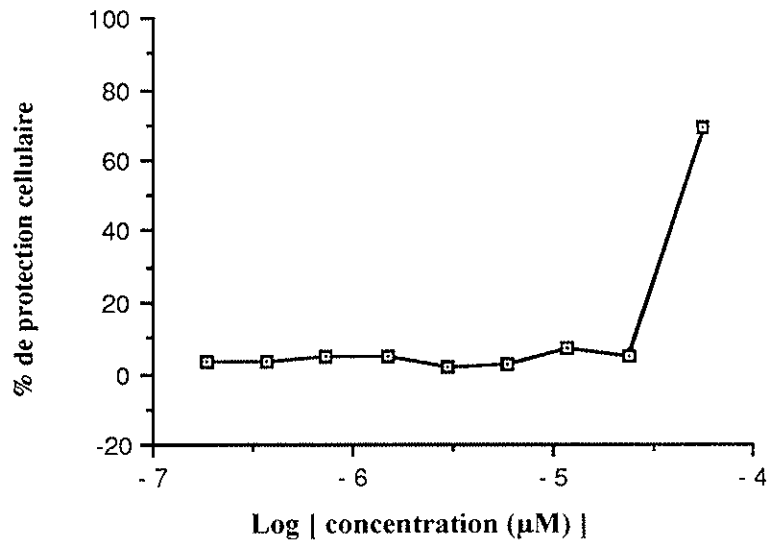


Figure 50 : activité antivirale de la molécule R2 sur la souche VISNA exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

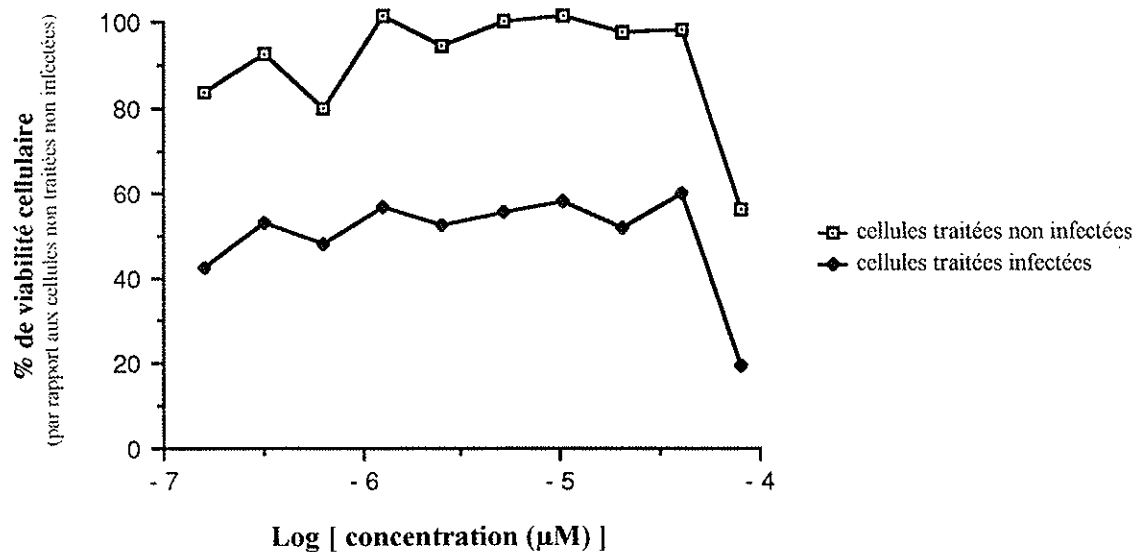


Figure 51 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule **R2** sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus **MAEDI**.

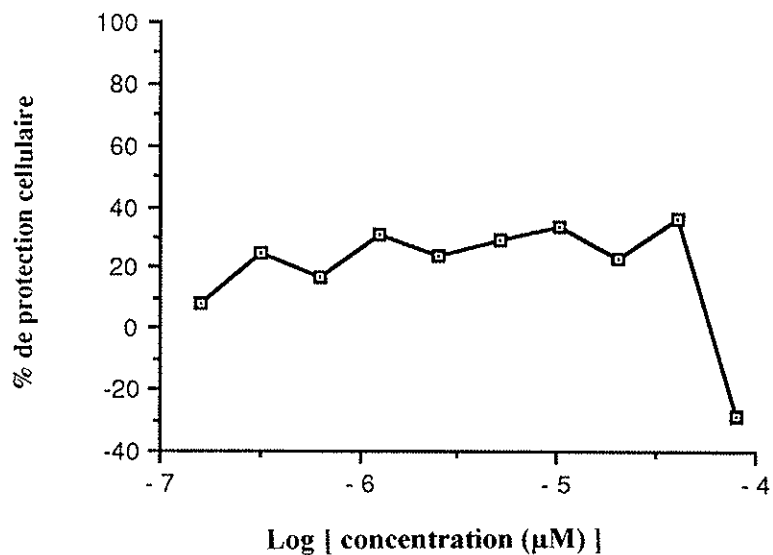


Figure 52 : activité antivirale de la molécule **R2** sur la souche **MAEDI** exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

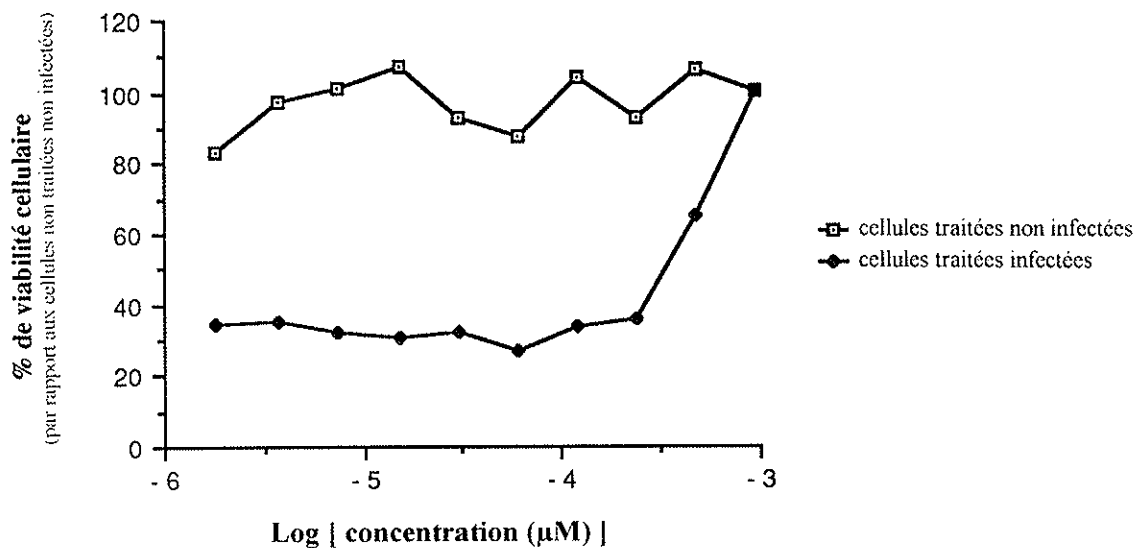


Figure 53 : courbe de viabilité cellulaire: effet de la molécule ddC sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA.

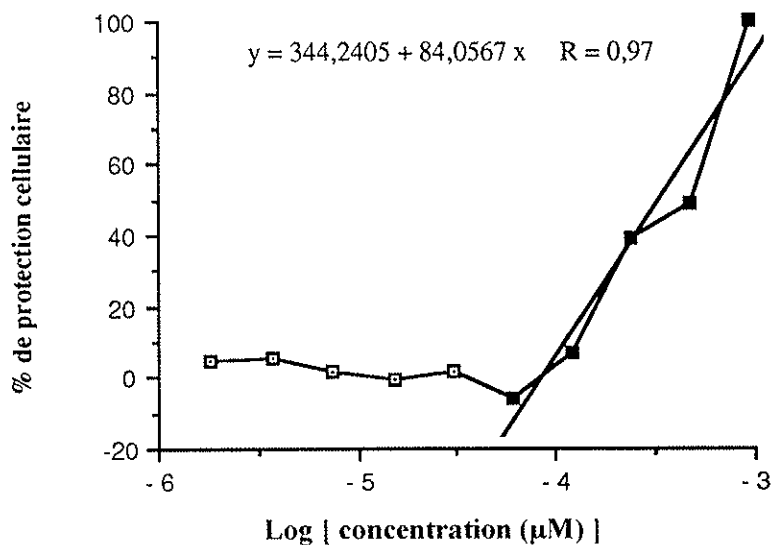


Figure 54 : activité antivirale de la molécule ddC sur la souche VISNA exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

| | CC 50 | CI 50 | |
|--------|--------------------------|-------------------|------------|
| | | VISNA | MAEDI |
| AB 112 | > 500 μM | 348 μM | - |
| AB 86 | 197 μM | 97 μM | non testée |
| AB 113 | 156 μM | 85 μM | non testée |
| R1 | \cong 83 μM | 54 μM | - |
| R2 | 77 μM | 48 μM | - |
| ddC | > 833 μM | 315 μM | non testée |

Tableau 14 : tableau récapitulatif des valeurs de CC 50 et de CI 50 déterminées pour 6 molécules testées sur des cellules de PC infectées par le virus VISNA ou le virus MAEDI.

IV - DISCUSSION :

Au cours de notre travail expérimental, nous nous sommes attachés à évaluer l'activité antivirale *in vitro*, sur le virus VISNA-MAEDI, de deux séries de molécules originales.

Les deux **composés R1 et R2** sont simplement inspirés des bases puriques. Ils comprennent une structure aromatique benzénique accolée à un hétérocycle à cinq sommets. Ce dernier contient trois hétéroatomes d'azote pour R1 et forme un noyau benzotriazole ; il en contient deux pour la molécule R2, formant un noyau benzimidazole. Plusieurs substituants sont greffés sur ces deux structures (amino en 6, méthoxy en 5) qui se différencient par l'atome en position 2 : un azote pour R1, et un carbone sur lequel est fixé un méthyle pour R2.

Les molécules de la **série AB 112, AB 86, AB 113** sont composées d'une base cyclique à six sommets possédant deux hétéroatomes d'azote en position 1 et 4 et une fonction cétone en position 2. Cette base est également reliée, par son azote en position 4, à un sucre à cinq sommets, le β -D-ribofuranose, par l'intermédiaire d'un chaînon propyle. Elles présentent donc une structure proche des désoxynucléosides naturels, avec toutefois quelques originalités. Tout d'abord la présence d'une chaîne aliphatique ou « bras spacer » qui réalise un lien neutre entre le sucre et la base. L'addition de ce « bras spacer » est connue pour affecter l'enroulement de l'ADN. Elle est également utilisée lors de la synthèse d'oligonucléotides antisens pour prévenir les phénomènes de dégradation par des nucléases. La seconde originalité réside dans la fixation sur la base, en position 3' de l'hétérocycle pipérazinique, d'une chaîne hydrophobe de longueur variable selon les composés (de 8 à 12 carbones), et visant à améliorer la pénétration cellulaire (19).

Lors de nos travaux, nous nous sommes heurtés à deux problèmes. Le premier concerne la **ddC** que nous avons choisie comme **molécule de référence**. Elle a été décrite, jusqu'à présent, comme le composé nucléosidique le plus efficace *in vitro* en tant qu'inhibiteur de la réplication du virus VISNA-MAEDI (182, 111). Nos résultats, au cours des différents essais réalisés, montrent son absence de toxicité aux concentrations moléculaires testées. Nous sommes ainsi en accord avec les données bibliographiques : THORMAR et coll. qui ont évalué la cytotoxicité de la ddC sur des cellules de PC de mouton par comptage avec un compteur Coulter, ont en effet déterminé une CC 50 > 100 μ M. L'évaluation de son efficacité antivirale a cependant soulevé quelques interrogations. THORMAR et coll. déterminent l'efficacité de la ddC *in vitro* avec une CI 50 de 0,02

μM avec le virus VISNA et des résultats sensiblement identiques avec le virus MAEDI. Au cours de ses travaux, LARROUTUROU observe l'effet antiviral de cette molécule avec des valeurs de CI 50 respectivement égales à 0,30 μM et 0,28 μM avec les virus VISNA et MAEDI. Quant aux résultats obtenus au cours de nos expérimentations, ils font apparaître une activité antivirale, mais à des concentrations moléculaires beaucoup plus élevées. Cette disparité n'a pas été observée avec l'AZT au cours d'essais réalisés précédemment dans le laboratoire. Ce composé protège moins efficacement les cellules de PC, vis-à-vis de l'infection par le virus VISNA-MAEDI, que la ddC. Ceci a été expliqué par des différences dans la capacité des cellules de PC de mouton à métaboliser ces deux molécules en dérivés actifs. L'AZT est cependant un inhibiteur puissant et non toxique de la réplication du VISNA-MAEDI *in vitro*. Les résultats fournis par divers auteurs, quelle que soit la méthode d'évaluation de l'activité antivirale, sont plus homogènes, de l'ordre du micromolaire (19, 111, 182).

Il est à noter que notre **protocole expérimental** diffère de ceux utilisés par LARROUTUROU et THORMAR et coll. (tableau 15). Le mode de lecture que nous avons choisi est en effet la méthode colorimétrique au MTT. Nous avons adopté cette méthode en raison de sa fiabilité, de sa facilité d'exécution et de sa rapidité ; elle permet d'évaluer en même temps la cytotoxicité et l'activité antivirale de la substance testée. Au contraire, la détermination de l'effet cytopathogène par la technique au MGG, utilisée par THORMAR et coll. et LARROUTUROU, est une méthode fastidieuse basée sur l'observation au microscope de la formation de syncytia. Elle est donc assez subjective et sujette à des erreurs. Ceci explique pourquoi l'utilisation de la technique au MTT tend à se généraliser lors des recherches de molécules à visée antirétrovirale ou anticancéreuse.

Dans le protocole de THORMAR et coll., le nombre de cellules par puits est plus faible. Cependant, ces cellules sont laissées 4 ou 5 jours à l'étuve avant d'être infectées par le virus ; elles ont donc le temps d'adhérer et de se multiplier. La multiplicité d'infection est également plus faible de façon à dénombrer correctement les syncytia.

Peu de références dans la littérature bibliographique font mention des **composés actifs *in vitro* sur le virus VISNA** et encore moins sur **la souche MAEDI**. Celles-ci montrent cependant une concordance de la réponse des deux souches face à une activité antirétrovirale (111, 182). Ceci s'explique par leur homologie, bien que l'effet cytopathique induit par le virus MAEDI se développe moins rapidement que pour la souche VISNA, et que les deux virus soient responsables de pathologies différentes. Pourtant, au cours de notre travail, nous avons

| | Cellules | | Traitement et Inf. virale | Souche virale | Multiplicité d'infection | Incubation | % protec. déterminé par | Utilisation d'AB |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|---------------|--------------------------|------------|-------------------------|------------------|
| THORMAR (182) | PC | tapis | en même temps | Visna K 796 | 0,05 | 6 jours | inh. ECP / MGG | oui |
| | 6.10 ³ /puits | adhérent | | | | | | |
| LARROUTUROU (111) | PC | tapis | en même temps | Visna K 796 | 0,15 | 6 jours | inh. ECP / MGG | oui |
| | 1.10 ⁴ /puits | adhérent | | | | | | |
| NOTRE PROTOCOLE | PC | cell. en suspension | en même temps | Visna K 796 | 0,5 | 6 jours | viab. cell. / MTT | non |
| | 2.10 ⁴ /puits | puis adhérentes | | | | | | |

Tableau 15 : comparaison de trois protocoles d'évaluation d'activité antivirale

- inf. : infection
- % protec. : pourcentage de protection cellulaire
- AB : antibiotiques
- PC : cellules de plexus choroïdes de mouton
- inh. : inhibition
- viab. cell. : viabilité cellulaire

constaté des résultats parfois contradictoires. En effet, l'efficacité de la molécule AB 112 constatée avec la souche VISNA n'apparaît pas avec la souche MAEDI. De même, les concentrations inhibitrices 50 des molécules R1 et R2 n'ont pu être déterminées vis-à-vis du virus MAEDI. La faible quantité de composés AB 86 et AB 113 dont nous avons disposé ne nous a pas permis de déterminer la capacité de protection de cette molécule vis-à-vis du MAEDI et donc de confirmer ou d'infirmer l'efficacité observée avec le virus VISNA.

Nous nous sommes en fait heurtés à un **second problème avec la souche MAEDI** qui, rappelons-le, présente un titre infectieux inférieur à celui de la souche VISNA utilisée. Nous avons constaté, au cours de nos manipulations, de faibles différences entre les DO relatives aux cellules non infectées traitées et les DO relatives aux cellules infectées traitées (figure 39 par exemple). Or il faut au minimum une diminution des DO de 50% pour pouvoir apprécier l'effet d'un agent antiviral (40). Les faibles différences que nous avons observées peuvent s'expliquer en partie par la lenteur du virus MAEDI à induire un effet cytopathique et par son titre infectieux moindre. Nous avons cependant tenté de minimiser ces inconvénients, d'une part en augmentant le volume de l'inoculum viral dans chaque cupule, d'autre part en prolongeant le temps d'incubation à 9 jours, limite au delà de laquelle les cellules meurent. Un autre facteur peut également entrer en ligne de compte, il s'agit de l'activité déshydrogénase des cellules qui peut persister un certain temps après leur mort, et expliquer en partie les forts niveaux d'absorbance des cupules infectées traitées.

L'évaluation des différentes molécules effectuée sur les deux souches de virus permet tout de même de montrer la reproductibilité des courbes de viabilité cellulaire traduisant leur cytotoxicité.

Au cours de l'**évaluation de l'efficacité** des molécules **AB 112, AB 86 et AB 113**, nous observons des modifications de toxicité cellulaire et de protection vis-à-vis du virus en fonction de la longueur de la chaîne latérale hydrophobe. Avec AB 112, qui possède un groupement octyle en position 3 de l'hétérocycle, nous ne constatons aucune cytotoxicité aux concentrations testées. Elle apparaît par contre et semble même augmenter après substitution de ce groupement octyle par un décyle (AB 86) puis un dodécyle (AB113), avec des CC 50 de 197 et 156 μM . La substitution du radical octyle par des radicaux plus longs est également à l'origine d'une augmentation de l'activité antivirale de ces composés : elle est très faible pour AB 112 avec une CI 50 de 348 μM , et s'élève pour les molécules AB 86 et AB 113 avec des CI 50 de 97 et 85 μM . Cependant, compte tenu de la valeur trop élevée de la CI 50 pour AB 112 et des indices de sélectivité (IS) beaucoup trop faibles pour AB 86 et AB 113 (de l'ordre de 2), nous pouvons considérer comme tout à fait négligeable l'intérêt antiviral de ces composés.

L'évaluation de l'efficacité des molécules **R1 et R2** n'a pas mis en évidence d'intérêt antiviral. Bien que nous puissions déterminer leur CI 50, respectivement de 54 et 48 μM , nous remarquons que leur toxicité vis-à-vis des cellules de PC se manifeste à des concentrations très proches et somme toute relativement faibles (CC 50 de 77 μM pour R1 et proche de 83 μM pour R2). Leurs IS mettent bien en évidence ce handicap majeur avec une valeur proche de 1,6. A titre d'exemple, THORMAR et coll. déterminent pour la ddC un IS > 5000 (182), et BENJAHAD et coll. trouvent pour l'AZT un IS > 100 (19).

Nous terminerons en rappelant que nous avons évalué l'activité antivirale à partir de cellules primaires, plus sensibles à l'infection et plus difficiles à entretenir que les cellules de lignée, et en soulignant l'importance des types cellulaires employés lors d'essais d'évaluation d'activités antivirales qui peuvent être à l'origine de variations dans les résultats.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, force est de constater que les cibles potentielles d'intervention des antirétroviraux sont nombreuses, et qu'il existe une quantité non négligeable de composés capables d'inhiber efficacement *in vitro* la réplication virale au niveau de ces différentes cibles.

☆ Pourtant, une infime minorité de ces composés est parvenue jusqu'à une utilisation en pratique clinique dans le traitement de l'infection par le VIH. Ce contraste met bien en évidence la **difficulté de la mise au point d'une thérapeutique antirétrovirale** qui tient à deux problèmes principaux :

⇒ d'une part, en utilisant la « machinerie » de la cellule hôte pour se répliquer, le virus complique la recherche d'inhibiteurs de la réplication qui ne soient pas toxiques pour la cellule elle-même.

⇒ d'autre part, une molécule qui présente une activité antirétrovirale intéressante, associée à une toxicité faible ou absente, ne constitue pas forcément un avenir thérapeutique. Encore faut-il qu'elle atteigne son site d'action, et sous sa forme active. La biodisponibilité, qui dépend étroitement des caractéristiques pharmacocinétiques, va jouer un rôle primordial. Quantité de composés perdent leur intérêt à cause d'une mauvaise absorption (composés polyanioniques par exemple), d'une mauvaise distribution, d'une dégradation en dérivés inactifs (dégradation des polymères sulfatés par des sulfatases), d'une métabolisation en composés toxiques, etc...

☆ Huit molécules antirétrovirales sont actuellement **disponibles en thérapeutique**, et ont comme cibles deux enzymes virales : la transcriptase inverse et la protéase. Les analogues nucléosidiques représentent la première classe de composés antirétroviraux ayant démontré une activité chez les sujets infectés. Ils comptent à ce jour l'AZT, la ddC, la ddI, le d4T et le 3TC. Le développement plus récent des antiprotéases (saquinavir, ritonavir et indinavir) a ouvert de nouvelles perspectives au traitement de l'infection par le VIH. Ils offrent un niveau d'action différent et annoncent des résultats prometteurs lors d'essais cliniques les associant aux analogues nucléosidiques.

☆ Malheureusement, tous ces composés sont loin d'être parfaits, ils présentent **certaines limites** qui rendent leur utilisation délicate, et qui sont à l'origine d'une baisse de leur efficacité au cours du temps.

⇒ Tout d'abord, leur **toxicité résiduelle**, bien que réduite à son minimum, reste un élément dont il faut tenir compte. La spécificité d'action sur les étapes de la réplication virale pouvant difficilement être absolue, ils

gardent une cytotoxicité à vrai dire très variable d'un produit à l'autre. Cette toxicité est à l'origine d'effets secondaires, plus ou moins marqués selon les individus, dont l'importance imposera l'arrêt de la thérapeutique en cause dans les cas les plus extrêmes, ou pourra être à l'origine d'une altération de la qualité de vie des patients et d'une mauvaise compliance au traitement, avec les conséquences que cela peut entraîner, notamment en ce qui concerne les phénomènes de résistance.

⇒ Mais surtout, leur **efficacité est incomplète et transitoire**. Ils ne bloquent pas totalement la réplication virale et sont sans action sur l'infection latente puisqu'ils ne peuvent intervenir sur le génome viral intégré dans l'ADN cellulaire. Leur action est **virostatique** et non virucide. Cette inhibition incomplète, associée à un renouvellement incessant, rapide et important des virus, représente donc les conditions idéales de **sélection de mutants résistants** sous l'effet de la pression de sélection médicamenteuse, aussi bien *in vitro* en culture cellulaire, qu'*in vivo* chez les sujets traités (17).

L'émergence de souches résistantes est constante en présence de toutes les molécules antirétrovirales actuelles. Ces phénomènes de résistance sont le fait d'une ou plusieurs mutations au niveau de différents codons du génome viral ; ils se traduisent par une augmentation des valeurs de CI 50. Plusieurs mutations sont généralement nécessaires à l'acquisition d'une résistance, et chaque molécule antirétrovirale est caractérisée par une série de mutations potentielles. L'existence de points de mutation communs entre différents composés est à l'origine de **résistances croisées** (17, 28, 61, 185) qui seront d'autant plus marquées que ces mutations seront fortement associées à la résistance. Ainsi, par exemple, les souches virales ayant muté au niveau des codons 74 et 184 du gène pol sous la pression de la ddI présentent une résistance croisée avec la ddC. Les mutations des codons 103, 181 et 188 confèrent, quant à eux, une résistance croisée à tous les NNRTIs. Une résistance croisée totale est observée entre l'indinavir et le ritonavir. Les **modalités d'apparition** des résistances peuvent également varier selon les composés (28). En ce qui concerne les analogues de nucléosides, elles apparaissent de façon progressive, et les mutations responsables de résistance de haut niveau avec l'AZT par exemple, (codons 67 et 219 de la transcriptase inverse) sont rarement rencontrées dans les deux premières années de traitement. Au contraire, avec les NNRTIs, l'émergence de mutants résistants est très rapide (2 à 4 semaines) et atteint d'emblée des niveaux très élevés, avec des CI 50 multipliées par 100 voire 1000, ce qui est très rare avec les analogues nucléosidiques, excepté le 3TC. Quant aux IP, l'augmentation de CI 50 n'apparaît que lorsque trois mutations au moins sont présentes, puis est ensuite proportionnée au nombre et à l'importance des mutations.

L'apparition de mutants résistants est d'autant plus rapide que la réplication virale reste élevée sous traitement. Le meilleur moyen de **prévention** consiste donc à verrouiller le plus complètement possible la multiplication virale. D'où l'intérêt de certaines associations d'antirétroviraux. Des combinaisons judicieuses vont également permettre :

- de prévenir certaines résistances : citons par exemple le cas des associations AZT/ddI et AZT/ddC ; l'émergence de la mutation en 215 du gène pol induite par la zidovudine préviendrait dans une certaine mesure la sélection des mutations de résistance en 74 et 184 pour la ddI et de la ddC (61),

- de modifier les profils de résistance : l'association AZT/NNRTIs permet d'éviter la résistance de haut grade liée à la mutation 181, au profit d'une résistance de bas grade liée à toute une série d'autres mutations (61),

- de resensibiliser des souches résistantes : ce phénomène a été décrit pour des souches, porteuses de la mutation 215 de résistance à l'AZT, qui se comportent comme des souches sensibles par addition d'autres mutations. Il a été observé *in vitro* en ajoutant les mutations 181 (NNRTIs), 74 (ddI, ddC), ou encore 184 (ddI, ddC, 3TC), mais également *in vivo* au cours de l'association thérapeutique AZT/3TC (17, 60, 61).

Les phénomènes de résistance doivent donc être pris en compte dans les stratégies thérapeutiques de façon à favoriser le développement de nouveaux antirétroviraux plus efficaces à long terme, et à permettre une utilisation optimale des composés disponibles à ce jour et de leur combinaisons.

☆ Des **associations d'antirétroviraux** ont été envisagées pour tenter d'atténuer les limites des traitements actuels ; leurs objectifs sont multiples :

- ⇒ majorer l'effet antirétroviral,
- ⇒ alléger les effets toxiques,
- ⇒ limiter les phénomènes de résistance,
- ⇒ élargir l'étendue des cellules et tissus infectés soumis à l'activité antivirale.

Le choix d'une association doit tenir compte d'un certain nombre de paramètres, les combinaisons les plus intéressantes répondant à un maximum des critères suivants :

- ⊃ avoir une **activité synergique ou additive** : c'est le cas de nombreuses associations *in vitro*, que ce soit au sein d'une même classe d'antirétroviraux, ou avec des agents agissant à des niveaux différents,

- ⊃ associer des composés présentant des **profils de toxicité et de résistance différents**,

☞ agir sur des **cellules et tissus variés**, en associant, par exemple, des agents actifs sur des cellules quiescentes (3TC, ddI ou ddC) à des composés agissant dans des cellules activées (AZT ou d4T),

☞ agir à **différentes étapes du cycle de réplication**, avec des associations dites divergentes,

☞ **éviter les interactions médicamenteuses** éventuelles : certaines peuvent cependant être mises à profit lors d'une thérapeutique combinatoire. C'est le cas notamment de l'association ritonavir/saquinavir : le ritonavir, puissant inhibiteur du cytochrome P-450, augmente en effet la concentration plasmatique de saquinavir d'un facteur 30 à 40,

☞ présenter une **facilité d'administration**.

Deux modalités de combinaisons sont possibles (60, 61) :

→ d'une part, les **combinaisons alternées** qui permettent de minimiser la toxicité mais ne potentialisent pas l'effet antiviral. Cette voie, bien que peu explorée, ne semble pas une voie d'avenir, car elle ne satisfait pas à suffisamment de critères évoqués précédemment, en particulier en n'augmentant pas une efficacité qui n'est déjà qu'incomplète. De plus, le risque d'apparition de mutations de résistance est élevé, même si des essais réalisés avec l'association AZT/ddC semblent montrer une conservation de la sensibilité des virus.

→ d'autre part, les **combinaisons simultanées** qui constituent une voie assurément plus intéressante et beaucoup plus étudiée. De nombreuses associations **bithérapeutiques** ont été testées *in vitro* et ont montré un bénéfice par rapport à un traitement unique. Des essais *in vivo* ont confirmé la supériorité de certaines de ces associations tant sur le plan biologique que clinique. Par exemple, les essais Delta, ACTG 175 et CAESAR ont montré la supériorité des traitements AZT/ddI, AZT/ddC et AZT/3TC par rapport au traitement par AZT seul.

Les **trithérapies** sont encore plus attrayantes *in vitro*, et les résultats préliminaires d'essais *in vivo* réalisés chez l'homme semblent montrer une supériorité sur les bithérapies, avec parfois des résultats spectaculaires. L'essai ACTG 214 a par exemple permis de mettre en évidence la supériorité de la combinaison AZT/ddI/névirapine sur celle AZT/ddI sur les plans cliniques et biologiques ; l'essai ACTG 229 a révélé un bénéfice biologique supérieur avec l'association AZT/ddC/saquinavir qu'avec AZT/ddC ou AZT/saquinavir (150).

Si l'on fait un rappel sur l'historique du traitement antituberculeux, il est certain que seule une triple association a permis de vaincre cette maladie. Les associations d'antirétroviraux sont devenues une règle dans les nouvelles stratégies thérapeutiques et constituent une avancée importante, notamment grâce à l'arrivée des

inhibiteurs de la protéase qui ont permis d'augmenter les possibilités d'associations. Il ne faut cependant pas oublier que les molécules actuellement disponibles en pratique clinique sont peu nombreuses, limitant non seulement le nombre des associations potentielles, mais surtout les possibilités de substitution chez des patients intolérants ou non répondeurs à certaines combinaisons. De plus, l'activité antivirale n'a été évaluée que sur de courtes périodes pour la plupart des polythérapies. Beaucoup de questions se posent encore sur l'efficacité à long terme de tels traitements, leurs indications et la surveillance de leur activité.

☆ La thérapeutique antirétrovirale, bien qu'ayant bénéficié de nombreux progrès récents avec la mise à disposition de molécules d'une nouvelle classe (les IP) et l'arrivée de nouveaux concepts thérapeutiques et pathogéniques (supériorité des associations, meilleure connaissance de la dynamique de la réplication virale et des phénomènes de résistance, notion de charge virale plasmatique indétectable, etc...), se heurte à la complexité de la situation actuelle et à la fragilité des repères, laissant un certain flou devant lequel se retrouvent les praticiens.

En pratique, les questions sans réponse restent nombreuses. Personne ne peut prétendre actuellement savoir comment utiliser de façon optimale la petite dizaine d'antirétroviraux disponibles (quelles combinaisons utiliser, dans quel ordre, quels critères de décision utiliser pour l'initiation ou le changement d'un traitement, quels objectifs se fixer, quelle conduite adopter en cas d'échec ou d'intolérance ?, etc...).

La mise à disposition d'un nombre croissant de médicaments et d'associations rend de plus en plus délicate leur évaluation au cours d'essais cliniques à long terme.

L'appréciation des bénéfices se base de plus en plus sur des mesures de la charge virale. Mais les seuils de détection varient selon les tests, et surtout, quelle est la signification d'une charge virale devenue indétectable dans le plasma, même si elle est maintenue longtemps, sur l'évolution à long terme de l'infection, compte tenu de l'ensemble des compartiments infectés ?

Les différents traitements ne montrent pas la même efficacité chez tous les patients. Jusqu'à présent, les patients « naïfs » ont mieux répondu aux thérapeutiques que les patients prétraités, ce qui souligne l'extrême importance du premier traitement. Il semble également que les sujets qui ont une infection récente et une charge virale basse soient ceux qui bénéficient le plus des thérapeutiques.

Il n'est donc possible, compte tenu de l'évolutivité des connaissances et des variations individuelles (hétérogénéité des patients et des souches virales), que de proposer des ébauches de recommandations basées sur des éléments-clés, afin d'optimiser une gestion de la thérapeutique qui pourrait devenir un traitement à la carte,

individualisé en fonction du profil virologique, clinique et immunologique de chaque patient. L'objectif primordial actuellement consiste à réduire et à maintenir la charge virale à un niveau le plus bas possible, meilleur garant de la non-sélection de souches résistantes, même si le niveau précis de la charge virale à atteindre n'est pas clairement identifié. L'intérêt d'un traitement précoce, quand la population virale est la plus homogène, et agissant en synergie avec le système immunitaire, est également souligné.

☆ La recherche de nouveaux antirétroviraux plus puissants, moins toxiques, d'administration facile, susceptibles d'intervenir à des niveaux variés du cycle de réplication viral, et pourquoi pas actifs sur les virus à l'état latent, reste donc une priorité si l'on veut parvenir à contrôler l'infection par le VIH, voire à obtenir une éradication du virus.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **AGUT H., AUDEVAL B., BEAUGERIE L., BOUVET E., CALVEZ V., CAUMES E., DESCAMPS D., DUPIN N., SINET M., HIRSCH E., et TRICOIRE J.**
En direct des congrès-Vancouver, 1996, 39 : 1-20.
- 2 - **AGUT H., FILLET A.M. et HURAUX J.M.**
La chimiothérapie antivirale : mécanismes d'action, évaluation d'activité, résistance et futurs développements.
Path. Biol., 1993, 41 (8bis) : 770-776.
- 3 - **ALFANDARI S., BANI SADR F. et SEMAILLE C.**
Traitements antirétroviraux.
La Lettre de l'Infectiologue, 1996, XI (14) : 429-444.
- 4 - **ALKHATIB G., COMBADIÈRE C., BRODER C.C., FENG Y., KENNEDY P.E., MURPHY P.M. and BERGER E.A.**
CC-CKR-5 : a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.
Science, 1996, 272 : 1955-1958.
- 5 - **ALLEY M.C., SCUDIERO D.A., MONKS A., HURSEY M.L., CZERWINSKI M.J., FINE D.L., ABBOTT B.J., MAYO J.G., SHOEMAKER R.H. and BOYD M.R.**
Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay.
Cancer Res., 1988, 48 : 584-601.
- 6 - **ARDOIN P.**
Techniques de base. Virologie et diagnostic virologique.
Paris : Ed. Maloine S.A., 1983.
- 7 - **ARENAS J.E., LAM K.T. and LILLIE J.**
High throughput screening for small molecule inhibitors of the HIV Rev-RRE interaction.
Scriptgen pharmaceuticals, Inc. Medford, MA 02155 U.S.A., 1995.
- 8 - **AYISI N.K., GUPTA S.V. and QUALTIERE L.F.**
Modified tetrazolium-based colorimetric method for determining the activity of anti-HIV compounds.
J. Virol. Methods, 1991, 33 : 335-344.
- 9 - **BALAKRISHNAN M. and JONSSON C.B.**
Functional identification of nucleotides conferring substrate specificity to retroviral integrase reactions.
J. Virol., 1997, 71 (2) : 1025-1035.
- 10 - **BALZARINI J., NEYTS J., SCHOLS D., HOSOYA M., VAN DAMME E., PEUMANS. and DE CLERCQ E.**
The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*.
Antiviral Research, 1992, 18 : 191-207.
- 11 - **BANI SADR F. et SEMAILLE C.**
Epidémiologie - Transmission - Facteurs pronostiques.
La Lettre de l'Infectiologue, 1996, XI (14) : 410-418.
- 12 - **BARRE-SINOUSSE F.**
Succès et désarrois des sciences de la vie face au virus du sida.
Ann. Inst. Pasteur / actualités, 1994, 5 (1) : 3-8.

- 13 - **BARTHELEMY P.**
Synthèse et caractérisation de tensioactifs polymérisables; Polyanions à visée anti-VIH.
(Thèse Sciences Montpellier II, 1993).
- 14 - **BATISSE D. et MORAND P.**
Sciences fondamentales - Charge virale.
Lettre de l'Infectiologue, 1996, XI (14) : 406-409.
- 15 - **BAURIAUD R. and IZOPET J.**
Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).
Moniteur Internat - Infectiologie, 1995, V : 307-326.
- 16 - **BAZIN C. et REGNIER B.**
Les traitements antirétroviraux et leurs essais thérapeutiques.
Rev. Prat., 1992, 42 (2) : 148-153.
- 17 - **BELEC L.**
Les mécanismes complexes de la résistance aux antirétroviraux.
Transcriptase, 1996, 42 : 16-19.
- 18 - **BELORGEY-BISMUT C. et ALEXANDRE J.M.**
Les autorisations temporaires d'utilisation (ATU).
Transcriptase, 1996, 47 : 30.
- 19 - **BENJAHAD A., BENHADDOU R., GRANET R., KAOUADJI M., KRAUSZ P; PIEKARSKI S., THOMASSON F., BOSGIRAUD C. and DELEBASSEE S.**
Synthesis and antiretroviral evaluation of 3-alkyl 2-piperazinone nucleoside analogs.
Tetrahedron Letters, 1994, 35 (51) : 9545-9548.
- 20 - **BERKOVER I., MOSTOWSKI H., BULL T.E. and MURPHY D.**
CD4-IgG binding threshold for inactivation of human immunodeficiency virus type 1.
J. Infect. Dis., 1996, 173 : 863-869.
- 21 - **BILLICH A., HAMMERSCHMID F., PEICHL P., WENGER R., ZNKE G., QUESNIAUX V. and ROSENWIRTH B.**
Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1 : interference with HIV protein-cyclophilin A interactions.
J. Virol., 1995, 69 (4) : 2451-2461.
- 22 - **BLEUL C.C., FARZAN M., PAROLIN C., CLARK-LEWIS I., SODRSKI J. and SPRINGER T.A.**
The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and blocks human immunodeficiency virus type 1 entry.
Nature, 1996, 382 : 829-833.
- 23 - **BOSGIRAUD C.**
Le virus VISNA-MAEDI : étude ultrastructurale et mise au point des réactions ELISA et IMMUNOBLOT.
(Thèse Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques Limoges, 1987).
- 24 - **BOUCHARD N., LARENAUDIE B. et REMOND M.**
Le Visna du mouton.
Bull. Soc. Vet. Prat. de France, 1980, 64 (9) : 755-772.
- 25 - **BOUR S. and STREBEL K.**
The HIV type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 8285-8300.

- 26 - **BRAND D., SRINIVASAN K. and SODROSKI J.**
Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein.
J. Virol., 1995, 69 (1) : 166-171.
- 27 - **BRODIE S.J., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., KOENIG G., SNOWDER G.D. and DEMARTINI J.C.**
Maternal factors associated with prEnatal transmission of ovine lentivirus.
J. Infect. Dis., 1994, 169 (3) : 653-657.
- 28 - **BRUN-VEZINET F. et DESCAMPS D.**
Médicaments actifs contre les rétrovirus.
Rev. Prat., 1997, 47 : 631-638.
- 29 - **BRUN-VEZINET F., DESCAMPS D., LOUSSERT-AJAKA I. et SIMON F.**
Virulence des virus de l'immunodéficience humaine.
Rev. Prat., 1995, 45 (6) : 701-708.
- 30 - **BUGELSKI P., KIRSH R. and HART T.K.**
HIV protease inhibitors : effects on viral maturation and physiologic function in macrophages.
J. Leukoc. Biol., 1994, 56 : 374-380.
- 31 - **BUKOVSKY A.A., DORFMAN T., WEIMANN A. and GÖTTLINGER H.G.**
Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease.
J. Virol., 1997, 71 (2) : 1013-1018.
- 32 - **BUKRINSKAYA A.G., GHORPADE A., RAGLAND A.M., HEINZINGER N.K., SMITHGALL T.E., LEWIS R.E. and STEVENSON M.**
Phosphorylation of HIV-1 matrix protein is necessary for nuclear targeting of viral preintegration complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996, 93 (1) : 367-371.
- 33 - **BULGIN M.S.**
Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats.
Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract., 1990, 6 : 691-704.
- 34 - **CAMAUR D., and TRONO D.**
Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation.
J. Virol., 1996, 70 (9) : 6106-6111.
- 35 - **CARBON C., REGNIER B., SAIMOT G., VILDE J.L. et YENI P.**
Médicaments anti-infectieux.
Paris : Médecine sciences / Flammarion, 1994.
- 36 - **CHAMBONNET F., GREENLAND T., PATET J., GUIGUEN F., LABERGERIE E. et MORNEIX J.F.**
Lentivirus animaux et humains.
Sci. Vet. Med. Comp., 1988, 90 : 131-137.
- 37 - **CHEN B.K., GANDHI R.T. and BALTIMORE D.**
CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef.
J. Virol., 1996, 70 (9) : 6044-6053.
- 38 - **CHENG-MEYER C., LIU R., LANDAU N.R. and STAMATATOS L.**
Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR-5 coreceptor.
J. Virol., 1997, 71 (2) : 1657-1661.

- 39 - **CHESEBRO B., WEHRLY K., NISHIO J. and PERRYMAN S.**
Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 9055-9059.
- 40 - **CHEVALERIAS D.**
Adaptation de la méthode colorimétrique au sel de tétrazolium à l'évaluation de la viabilité des cellules infectées par le virus Visna.
(Thèse Pharm. Limoges, 1995).
- 41 - **CLANTON D.J., MORAN R.A., McMAHON J.B., WEISLOW O.S., BUCKHEIT R.W., HOLLINGSHEAD M.G., CIMINALE V., FELBER K., PAVLAKIS G.N. and BADER J.P.**
Sulfonic acid dyes : inhibition of the human immunodeficiency virus and mechanism of action.
Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 1992, 5 : 771-781.
- 42 - **CLAVEL F.**
Données virologiques nouvelles : réplication et persistance du virus de l'immunodéficience humaine.
Rev. Prat., 1992, 42 (2) : 142-146.
- 43 - **CLEMENTS J.E., ZINCK M.C., NARAYAN O. and GABUZDA D.H.**
Lentivirus infection of macrophages.
Immunol. Ser., 1994, 60 : 589-600.
- 44 - **COFFIN J.M.**
HIV population dynamics *in vivo* : implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy.
Science, 1995, 267 : 483-489.
- 45 - **CONNOLLY K.J. and HAMMER S.M.**
Antiretroviral therapy : strategies beyond single-agent reverse transcriptase inhibition.
Antimicrob. Agents Chemother., 1992, 36 (3) : 509-520.
- 46 - **CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. and JACKSON T.A.**
Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus.
Am. J. Vet. Res., 1981, 42 : 1795-1797.
- 47 - **CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., SCHMERR M.J.F. and BROGDEN K.A.**
Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep.
Vet. Microbiol., 1988, 17 : 237-250.
- 48 - **D'AGOSTINO D., CIMINALE V., PAVLAKIS G. and CHIECHO-BIANCHI L.**
Intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: involvement of continued rRNA synthesis in nuclear retention.
AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1995, 11 : 1063-1070.
- 49 - **DAVEY R.T., BOENNING C.M., HERPIN B.R., BATTS D.M., METCALF J.A., WATHEN L., COX S.R., POLIS M.A., KOVACS J.A., FALLOON J., WALKER R.E., SALZMAN M., MAZUR H. and LANE H.C.**
Use of recombinant soluble CD4 Pseudomonas exotoxin, a novel immunotoxin, for treatment of persons infected with human immunodeficiency virus.
J. Infect. Dis., 1994, 170 : 1180-1188.
- 50 - **DE CLERCQ E.**
Trends in drug development for the treatment of AIDS compounds interfering with the initial stages of the HIV replicative cycle.
Eur. J. Pharm. Sciences, 1994, 2 : 4-6.

- 51 - **DE CLERCQ E., YAMAMOTO N., PAUWELS R., BABA M., SCHOLS D., NAKASHIMA H., BALZARINI J., DEBYSER Z., MURER B.A., SCHWARTZ D., THORNTON D., BRIDGER G., FRICKER S., HENSON G., ABRAMS M. and PICKER D.**
Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 89 (12) : 5286-5290.
- 52 - **DEEKS S.G., SMITH M., HOLODNIY M. and KAHN J.O.**
HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians.
JAMA, 1997, 277 (2) : 145-153.
- 53 - **DELFRAISSY J.F. et GOUJARD C.**
Les inhibiteurs de protéase.
Transcriptase, 1996, 47 : 11-18.
- 54 - **DELFRAISSY J.F. et HOMBOURGER R.**
Evolution du traitement par les analogues nucléosidiques.
La Presse Médicale, 1993, 22 (40) : 1984-1985.
- 55 - **DELLAMONICA P., CARLES M., ALFANDARI S. et MOUTON Y.**
Infection à VIH.
Impact Internat, 1992 : 205-220.
- 56 - **DENIZOT F. and LANG R.**
Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.
J. Immunol. Methods, 1986, 89 : 271-277.
- 57 - **DI MARZIO P., CHOE S., EBRIGHT M., KNOBLAUCH R. and LANDAU N.R.**
Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization, and virion packaging of HIV type 1 Vpr.
J. Virol., 1995, 69 (9) : 7909-7916.
- 58 - **DION F.**
Mise en place et évolution de la prophylaxie du visna-maedi en France.
Le Point Vétérinaire, 1991, 23 (139) : 39-51.
- 59 - **DORFMAN T. and GÖTTLINGER H.G.**
The human immunodeficiency virus type 1 capsid p2 domain confers sensitivity to the cyclophilin-binding drug SDZ NIM 811.
J. Virol., 1996, 70 (9) : 5751-5757.
- 60 - **DORMONT J. et ABOULKER J.P.**
Les traitements antirétroviraux dans les infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).
Rev. Prat., 1994, 44 (12) : 1635-1642.
- 61 - **DORMONT J., BRUN-VEZINET F., YENI P. et ABOULKER J.P.**
Les antirétroviraux.
Médecine Thérapeutique, 1996, 2 (HS) : 127-135.
- 62 - **DRAGIC T., LITWIN V., ALLAWAY G.P., MARTIN S.R., HUANG Y., NAGASHIMA K.A., CAYANAN C., MADDON P.J., KOUP R.A., MOORE J.P. and PAXTON W.A.**
HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.
Nature, 1996, 381 : 667-673.
- 63 - **DURANT J. et DELLAMONICA P.**
Les anti-rétroviraux.
Méd. Mal. Infect., 1996, 26 : 45-52.

- 64 - **DURET P.**
Inhibiteurs de l'aspartyl-protéase du virus de l'immunodéficience humaine. Purification d'un métabolite secondaire anti-VIH-1.
(Thèse Pharm. Paris VI, 1993).
- 65 - **ELLISON V., GERTON J., VINCENT K.A. and BROWN P.O.**
An essential interaction between distinct domains of HIV-1 integrase mediates assembly of the active multimer.
J. Biol. Chem., 1995, 270 (7) : 3320-3326.
- 66 - **FESEN M.R., POMMIER Y., LETEURTRE F., HIROGUCHI S., YUNG J. and KOHN W.**
Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) and related compounds.
Biochem. Pharmacol., 1994, 48 (3) : 595-608.
- 67 - **FLETCHER R.S., SYED K., MITHANI S., DMITRIENKO G.I. and PARNIAK M.A.**
Carboxanilide derivative non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase interact with different mechanistic forms of the enzyme.
Biochemistry, 1995, 34 : 4346-4353.
- 68 - **FONTENAY F. et CERTAIN A.**
Antiprotéases : métabolisation, interactions et contre-indications.
Le Journal du sida, 1996, 84 : 5-9.
- 69 - **FONTENAY F. et CHAMBON J.F.**
Vancouver. XI^e conférence internationale sur le sida.
Le Journal du sida, 1996, 88 (suppl 1) : 1-9.
- 70 - **FOUCHIER R., SIMON J., JAFFE A. and MALIM M.**
Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins.
J. Virol., 1996, 70(12) : 8263-8269.
- 71 - **FRANCKI R.I.B., FAUQUET C.M., KNUDSON D.L. et BROWN F.**
Classification et nomenclature des virus.
Paris : Ed. Springer-Verlag, 1994.
- 72 - **FRANK K.B., Mc KERNAN P.A., SMITH R.A. and SMEE R.F.**
Visna virus as an in vitro model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides.
Antimicrob. agents Chemother., 1987, 31 (9) : 1369-1374.
- 73 - **GALETTO-LACOUR A., YERLY S., PERNEGER T.V., BAUMBERGER C., HIRSCHL B., PERRIN L. and the Swiss HIV Cohort Study Group.**
Prognostic value of viremia in patients with long-standing human immunodeficiency virus infection.
J. Infect. Dis., 1996, 173 : 1388-1393.
- 74 - **GAO W.Y., JOHNS D.G., CHOKEKUCHAI S. and MITSUYA H.**
Disparate actions of hydroxyurea in potentiation of purine and pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside activities against replication of HIV.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995, 92 (18) : 8333-8337.
- 75 - **GEORGSSON G.**
Neuropathologic aspects of lentiviral infections.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1994, 724 : 50-67.
- 76 - **GEORGSSON G., ANDRESDOTTIR V., PALSSON P.A. and PETURSSON G.**
Visna og AIDS, nogle komparative aspekter.
Nord. Med., 1991, 106 (4) : 112-115.

- 77 - **GEORGSSON G., TORSTEINSDOTTIR S., PETURSSON G., PALSSON P.A. and ANDRESSON O.**
Role of the immune response in Visna, a lentiviral central nervous system disease of sheep.
In : *Animal models of HIV and other retroviral infections*.
S. Karger, Basel, 1993 : 183-195.
- 78 - **GIACCA M., ZANUSSI S., COMAR M., SIMONELLI C., VACCHER E., DE PAOLI P. and TIRELLI U.**
Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea : virologic and clinical evaluation.
J. Infect. Dis., 1996, 174 : 204-209.
- 79 - **GILQUIN J.**
Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse. Mécanismes, molécules, résistances.
Transcriptase, 1996, 47 : 2-10.
- 80 - **GIRARD P.M.**
SIDA : l'année 1996.
Méd. Mal. Infect., 1997, 27 : 31-39.
- 81 - **GOLDFARB D.**
Viruses : the Trojan horse of the cell.
Trends in Cell Biology, 1996, 6 : 8-15.
- 82 - **GONDA M.A. and OBERSTE M.S.**
AIDS - The human immunodeficiency virus : molecular and structural aspects of its biology.
In : *Control of Virus Diseases*.
New York : Ed. E. Kurstak , 1992 : 3-31.
- 83 - **GONDA M.A., WONG-STAAAL F., GALLO R.C., CLEMENTS J.E., NARAYAN O. and GILDEN R.V.**
Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and Visna virus a pathogenic lentivirus.
Science, 1985, 227 : 173-177.
- 84 - **GUEDJ R.**
Les cibles de la recherche.
Le journal du sida, 1996, 83 : 14-17.
- 85 - **HARMACHE A., BOUYAC M., AUDOLY G., HIEBLOT C., PEVERI P., VIGNE R. and SUZAN M.**
The Vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle.
J. Virol., 1995, 69 (6) : 3247-3257.
- 86 - **HARRIS M. and COATES K.**
Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 nef gene product in vitro : a role for myristylation.
J. Gen. Virol., 1993, 74, : 1581-1589.
- 87 - **HARROVE G. and CHENG-MAYER C.**
Amino acid substitution in the V3 loop are responsible for adaptation to growth in transformed T-cell lines of a primary human immunodeficiency virus type 1.
Virology, 1995, 210 : 490-494.
- 88 - **HIRSCH M.S. and D'AQUILA R.T.**
Therapy for human immunodeficiency virus infection.
N. Engl. J. Med., 1993, 328 (23) : 1686-1695.

- 89 - **HO D.D., NEUMANN A.U., PERELSON A.S., CHEN W., LEONARD J.M. and MARKOWITZ M.**
Rapid turnover of plasma virion and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.
Nature, 1995, 373 : 123-126.
- 90 - **HODGES T.L., KAHN J.O., KAPLAN L.D., GROOPMAN J.E., VOLDERBING R.A., ARMAN A.J., ARRI C.J., BOUVIER L.M., MORDENTI J., IZU A.E. and ALLAN J.D.**
Phase I study of recombinant human CD4-immunoglobuline G therapy of patients with AIDS and AIDS-Related Complex.
Antimicrob. Agents Chemother., 1991, 35 (12) : 2580-2586.
- 91 - **HOSOYA M., BALZARINI J., SHIGETA S. and DE CLERCQ E.**
Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins.
Antimicrob. Agents Chemother., 1991, 35 (12) : 2515-2520.
- 92 - **HOUWERS D.J.**
Ovine lentivirus infections (maedi-visna, zwoergerziekte). Aspects of immunology, pathology, epidemiology and control.
(Thèse Université d'Utrecht, 1988).
- 93 - **HU D.J., DONDERO T.J., RAYFIELD M.A., GEORGE J.R., SCHOCHETMAN G., JAFFE H.W., LUO C.C., KALISCH M.L., WENIGER B.G., PAU C.P., SCHABLE C.A. and CURRAN J.W.**
The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research and prevention.
JAMA, 1996, 275 (3) : 210-216.
- 94 - **HUANG Y., ZHANG L. and HO D.D.**
Biological characterization of nef in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection.
J. Virol., 1995, 69 (12) : 8142-8146.
- 95 - **HWANG S.S., BOYLE T.J., LYERLY H.K. and CULLEN B.R.**
Identification of the envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1.
Science, 1992, 257 : 535-537.
- 96 - **IACAMPO S. and COCHRANE A.**
Human immunodeficiency virus type 1 Rev function requires continued synthesis of its target mRNA.
J. Virol., 1996, 70(12) : 8332-8339.
- 97 - **JAMIESON B.D., ALDROVANDI G.M., PLANELLES V., JOWETT J.B.M., GAO L., BLOCH L.M., CHEN I.S.Y. and ZACK J.A.**
Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for *in vivo* replication and pathogenicity.
J. Virol., 1995, 69 (9) : 7909-7916.
- 98 - **JANIER M.**
Guide pratique du sida.
Paris : Ed. La Gazette Médicale, 1996.
- 99 - **JANSEN R.W., SCHOLS D., PAUWELS R., DE CLERCQ E. and MEIJER D.K.F.**
Novel, negatively charged, human serum albumins display potent and selective *in vitro* anti-human immunodeficiency virus type 1 activity.
Mol. Pharmacology, 1993, 44 : 1003-1007.

- 100 - **JIANG S., LIN K., STRICK N. and NEURATH A.R.**
Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 195 : 533-538.
- 101 - **JOHNSON L.K., MEYER A.L. and ZINK M.C.**
Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, virus rescue and PCR.
Clin. Immunol. Immunopathol., 1992, 65 : 254-260.
- 102 - **KATZ R.A. and SKALKA A.M.**
The retroviral enzymes.
Annu. Rev. Biochem., 1994, 63 : 133-173.
- 103 - **KATZMAN M. and SUDOL M.**
In vitro activities of purified Visna virus integrase.
J. Virol., 1994, 68 (6) : 3558-3569.
- 104 - **KIENSLE N., BACHMAN M., MÜLLER W.E.G. and MUELLER-LANTZCH N.**
Expression and cellular-localization of the nef protein from the human immunodeficiency virus-1 in stably transfected B-cells.
Arch. Virol., 1992, 124 : 123-132.
- 105 - **KIM S., BYRN R., GROODMAN J. and BALTIMORE D.**
Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection : evidence for differential gene expression.
J. Virol., 1989, 63 : 3708-3713.
- 106 - **KLOTMAN M.E., KIM S., BUCHBINDER A., DEROSI A., BALTIMORE D. and WONG-STAAAL F.**
Kinetics of expression of multiplyspliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88 : 5011-5015.
- 107 - **KOHLEISEN B., NEUMAN M., HERRMANN R., BRACK-WERNER R., KROHN K.J.E., OVID V., RANKI A. and ERFLE V.**
Cellular localization of Nef expressed in persistently HIV-1 infected low producer astrocytes.
AIDS, 1992, 6 : 1427-1436.
- 108 - **KOZAK S.L., PLATT E.J., MADANI N., FERRO F.E., PEDEN K. and KABAT D.**
CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patients and laboratory-adapted isolates human immunodeficiency virus type 1.
J. Virol., 1997, 71 (2) : 873-882.
- 109 - **LAFEMINA R.L., GRAHAM P.L., LEGROW K., HASTING J.C., WOLFE A., YOUNG S.D., EMINI .A. and HAZUDA D.J.**
Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by bis-catechols.
Antimicrob. Agents Chemother., 1995, 39 (2) : 320-324.
- 110 - **LANDOLFO S., GRIBAUDO G., ANGERETTI A. and GARIGLIO M.**
Mechanism of viral inhibition by interferons.
Pharmacol. Ther., 1995, 65 (3) : 415-442.
- 111 - **LARROUTUROU S.**
Activité *in vitro* de substances antirétrovirales contre le virus Visna-Maedi. Evaluation de plusieurs méthodes.
(Thèse Doct. Pharm. Limoges, 1993).

- 112 - **LEFRERE P.J.J., VITTECOQ D. et MATTLINGER B.**
 Immunothérapie passive dans le SIDA : utilisation transfusionnelle de plasma riche en anticorps anti-p25 (essai de phase I).
 Rev. Fr. Transfus. Hemobiol., 1991, 34 : 199-211.
- 113 - **LEMAITRE M. et ZERIAL A.**
 Méthodes permettant le criblage et l'évaluation *in vitro* d'activités inhibitrices de la réplication du V.I.H.
 Revue française des laboratoires, 1990, 216 : 43-50.
- 114 - **LIN P.F., SAMANTA H., BECHTOLD C.M., DEMINIE C.A., PATICK A.K., RICCARDI K., ROSE R.E., WHITE R.J. and COLONNO R.J.**
 Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor.
 Antimicrob. Agents Chemother., 1996, 40 (1) : 133-138.
- 115 - **LORI F. and GALLO R.C.**
 Hydroxyurea and AIDS : an old drug finds a new application ?
 AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1995, 11 (10) : 1149-1151.
- 116 - **MALLEY S.D., GRANGE J.M., HAMED-SANGSARI F. and VILA J.R.**
 Synergistic anti human immunodeficiency virus type 1 effect of hydroxamate compounds with 2',3'-dideoxyinosine in infected resting human lymphocytes.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91 (23) : 11017-11021.
- 117 - **MARSH H.**
 Progressive pneumonia in sheep.
 J. Am. Vet. Med. Assoc., 1923, 62 : 458-473.
- 118 - **MATHERON S.**
 SIDA : actualités.
 Méd. Mal. Infect., 1996, 26 : 3-10.
- 119 - **MAYAUX J.F., BOUSSEAU A., PAUWELS R., HUET T., HENIN Y., DEREU N., EVERS M., SOLER F., POUJADE C., DE CLERCQ E. and LE PECQ J.B.**
 Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91 : 3564-3568.
- 120 - **MAZUMDER A., COONEY D., AGBARIA R., GUPTA M. and POMMIER Y.**
 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by 3'-azido-3'-deoxythymidylate.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91 : 5771-5775.
- 121 - **MAZUMDER A., RAGHAVAN K., WEINSTEIN J., KHON W. and POMMIER Y.**
 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by curcumin.
 Biochem. Pharmacol., 1995, 49 (8) : 1165-1170.
- 122 - **Mc KNIGHT A., WILKINSON D., SIMMONS G., TALBOT S., PICARD L., AHUJA M., MARSH M., HOXIE J.A. and CLAPHAM P.R.**
 Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent.
 J. Virol., 1997, 71 (2) : 1692-1696.
- 123 - **MELLORS J.W., KINGSLEY L.A., RINALDO C.R., HOO B.S., TODD J.A. and GUPTA P.**
 Quantiaition of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion.
 Ann. Intern. Med., 1995, 112 : 573-579.
- 124 - **MELLORS J.W., RINALDO C.R., GUPTA P., WHITE R.M., TODD J.A. and KINGSLEY L.A.**
 Prognosis in human immunodeficiency virus infection predicted by the quantity of virus in plasma.
 Science, 1996, 272 : 1167-1170.

- 125 - **MELTZER M.S., SKILMAN D.R., HOOVER D.L., HANSON B.D., TURPIN J.A., KALTER D.C. and GENDELMAN H.E.**
Macrophages and the immunodeficiency virus.
Immunol. Today, 1990, 11 (6) : 217-223.
- 126 - **MEYOHAS M.C., SCHNEIDER-FAUVEAU V., MEYNARD J.L. et FROTTIER J.**
Evolution du traitement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).
La Lettre du Pharmacologue, 1994, 8 (4) : 84-88.
- 127 - **MIAILHES P.**
Une nouvelle avancée dans la thérapie de l'infection à VIH et du SIDA.
La Lettre de l'Infectiologue, 1997, XII (1) : 30-32.
- 128 - **MITSUYA H.**
Development of inhibitors of reverse transcriptase and protease as therapeutics against HIV infection.
J. Enzyme Inhibition, 1992, 6 : 1-8.
- 129 - **MOHAN P.**
Anti-AIDS drug development : challenges and strategies.
Pharmaceutical Research, 1992, 9 (6) : 703-714.
- 130 - **MOHAN P.**
Problems and perspectives in the design of anti-HIV-1 agents.
Drug Dev. Res., 1993, 29 : 1-17.
- 131 - **MONTAGNIER L., BRUNET J.B., GLUCKMAN J.C., KLATZMAN D. et ROZENBAUM W.**
Sida.
Paris : Ed. Fondation internationale pour l'information scientifique, 1985.
- 132 - **MONTAGNIER L. and ALIZON M.**
The human immune deficiency virus (HIV) : an update.
Ann. Inst. Pasteur / Virol., 1987, 138 : 3-11.
- 133 - **MOORE J.P., McKEATING J.A., WEISS R.A. and SATTENTAU Q.J.**
Dissociation of gp120 from human immunodeficiency virus type 1 virions induced by soluble CD4.
Science, 1990, 250 : 1139-1142.
- 134 - **MORINET F.**
Mécanismes des maladies virales et moyens de défense naturelle.
Rev. Prat., 1997, 47 : 618-621.
- 135 - **MORNEX J.F., LENA P., LOIRE R., COZON G., GREENLAND T., GUIGEN F., JACQUIER M.R. and CORDIER G.**
Lentivirus-induced interstitial lung disease : pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus.
Vet. Res., 1994, 25 : 478-488.
- 136 - **MOUTOUH L., CALVEZ V. et HURAUX J.M.**
Avenir des médicaments antiviraux.
Rev. Prat., 1997, 47 : 652-657.
- 137 - **NAESENS L., BAZARINI J., BISCHOFBERGER N. and DE CLERCQ E.**
Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine, the bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine.
Antimicrob. Agents Chemother., 1996, 40 (1) : 22-28.

- 138 - **NARAYAN O. and CLEMENTS J.E.**
Biology and pathogenesis of lentivirus.
J. Gen. Virol., 1989, 70 : 1617-1639.
- 139 - **NILSSON A., LUNQVIST P., LÖVE A., TORFASON E., GELDERBLOM H.R. and HÖGLUND S.**
Spatial visualization of progressive states of maturing lentivirus.
Vet. Microbiol., 1992, 33 : 333-340.
- 140 - **OBERLIN E., AMARA A., BACHELERIE F., BESSIA C., VIRELIZIER J.L., ARENZANA-SEISDEDOS F., SCHWARTZ O., HEARD J.M., CLARK-LEWIS I., LEGLER D.F., LOETSCHER M., BAGGIOLINI M. and MOSER B.**
The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.
Nature, 1996, 382 : 833-835.
- 141 - **O'BRIEN W.A., HARTIGAN P.M., MARTIN D., ESINHART J., HILL A., BENOIT S., RUBIN M., SIMBERKOFF M.S. and HAMILTON J.D.**
Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and CD4+ lymphocytes counts and the risk of progression to AIDS.
N. Engl. J. Med., 1996, 334 : 426-431.
- 142 - **O'BRIEN W.A., KOYANAGI Y., NAMAZIE A., ZHAO J-Q., DIAGNE A., IDLER K., ZACK A. and CHEN I.S.Y.**
HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain.
Nature, 1990, 346 : 69-73.
- 143 - **PANTALEO G., GRAZIOSI C., DEMAREST J.F., BUTINI L., MONTRONI M., FOX C.M., ORENSTEIN J.M., KOTLER D.P. and FAUCI A.S.**
HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.
Nature, 1993, 362 (6418) : 355-358.
- 144 - **PANTALEO G., GRAZIOSI C. and FAUCI A.S.**
New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection.
N. Engl. J. Med., 1993, 328 (5) : 327-335.
- 145 - **PAUWELS R., BALZARINI J., BABA M., SNOECK R., SCHOLS D., HERDEWIJN P., DESMYTER J. and DE CLERQ E.**
Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds.
J. Virol. Methods, 1988, 20 : 309-321.
- 146 - **PAYMENT P. et TRUDEL M.**
Manuel de techniques virologiques.
Paris : Ed. Ellipses, 1989.
- 147 - **PEKELDER J.J., VEENINK G.J., AKKERMANS J.P., Van ELDIK P., ELVING L. and HOUWERS D.J.**
Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs.
Vet. Rec., 1994, 134 : 348-350.
- 148 - **PETURSSON G., ANDRESDOTTIR V., ANDRESSON O., TORSTEINSDOTTIR S., GEORGSON G. and PALSSON P.**
Human and ovine lentiviral infections compared.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 1991, 14 (4) : 277-287.
- 149 - **PISCITELLI S.C., FLEXNER C., MINOR J.R., POLIS M.M. and MASUR H.**
Drug interaction in patients infected with HIV.
Clin. Infect. Dis., 1996, 23 : 685-693.

- 150 - **PLESKOFF O.**
Molécules antivirales : le bilan s'améliore.
Science et vie, 1995, 193 (HS) : 134-139.
- 151 - **PLUMB J.A., MILROY R. and KAYE S.B.**
Effects of the pH dependence of 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay.
Cancer Res., 1989, 49 : 4435-4440.
- 152 - Poster « Rétrovirus »
Laboratoire Abbott, 1988.
- 153 - **RABOUD J.M., MONTANER J.S.G., CONWAY B., HALEY L., SHERLOCK C., O'SHAUGHNESSY M.V. and SCHECHTER M.T.**
Variation in plasma RNA levels, CD4 cell counts, and p24 antigen levels in clinically stable men with human immunodeficiency virus infection.
J. Infect. Dis., 1996, 174 : 191-194.
- 154 - **REEVES J.D. and SCHULZ T.F.**
The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope mediated fusion.
J. Virol., 1997, 71 (2) : 1453-1465.
- 155 - **REICIN A.S., OHAGEN A., HOGLUND S., and GOFF S.P.**
The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 8645-8652.
- 156 - Répertoire des essais thérapeutiques en France. VIH et SIDA.
Paris : Ed. Arcat-sida, 1995.
- 157 - **REYMEY D., CUSHMAN M., WANG P., WITVROUW M., ESTE J., NEYTS J. and DE CLERCQ E.**
Mechanism of anti-human immunodeficiency virus (HIV) action of selected ATA-polymer analogues.
Rega Institute for Medical Research, K.U. Leuven, B-3000 Leuven, 1995
- 158 - **RICE W.G., BAKER D., SCHAEFFER C.A., GRAHAM L., BU M., TERPENING S., CLANTON D., SCHULTZ R., BADER J.P., BUCKHEIT R.W., FIELD L., SINGH P.K. and TURPIN J.A.**
Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral nucleocapsid proteins.
Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 41 (2) : 419-426.
- 159 - **RICE W.G., SCHAEFFER C.A., TURPIN J.A., COREN L., SOWDER R.C., KANE B., BADER J., ARTHUR L.O. and HENDERSEN L.E.**
New classes of reagents that attack conserved and chemically reactive zinc fingers in retroviral nucleocapsid proteins : a strategy for rational drug design.
Science, 1995, 270 (5329) : 1194-1197.
- 160 - **ROSSI J.J. and SARVER N.**
RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents.
Trends Biotechnol., 1990, 8 (7) : 179-183.
- 161 - **ROY B. et FONTECAVE M.**
Le métabolisme des nucléosides et nucléotides : implications dans la recherche de nouveaux agents anti-VIH.
Bull. Inst. Pasteur, 1993, 91 : 89-100.

- 162 - **RUSCONI S., MOONIS M., MERRILL D.P., PALLAI P.V., NEIDHARDT E.A., SINGH S.K., OSBURNE M.S., PROFY A.T., JENSON J.C. and HIRSCH M.S.**
Naphthalene sulfonate polymers with CD4-blocking and anti-human immunodeficiency virus type 1 activities.
Antimicrob. Agents Chemother., 1996, 40 (1) : 234-236.
- 163 - **SAMSON M., LIBERT F. and DORANTZ B.J.**
Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutants alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature, 1996, 382 : 722-725.
- 164 - **SAVEY M., PARODI A.L., ESPINASSE J. et KIENER T.**
Aspects cliniques et anatomo-pathologiques du Maedi chez les ovins en France.
Le point Vétérinaire, 1982, 14 (66) : 47-52.
- 165 - **SCHINAZI R.F., MEAD J.R. and FEORINO P.M.**
Insight into HIV chemotherapy.
AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1992, 8 (6) : 963-989.
- 166 - **SCHORR J., KELLNER R., FACKLER O., FREUND J., KONVALINKA J., KIENZLE N., KRÄUSSLICH H.G., MUELLER-LANTZSCH N. and KALBITZER H.R.**
Specific cleavage sites of Nef proteins from human immunodeficiency virus type 1 and 2 for the viral proteases.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 9051-9054.
- 167 - **SCHUBERT U., CLOUSE K.A. and STREBEL K.**
Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes.
J. Virol., 1995, 69 (12) : 7699-7711.
- 168 - **SCHWARTZ O., MARECHAL V., DANOS O. and HEARD J.M.**
Human immunodeficiency virus type 1 nef increases the efficiency of reverse transcriptase in infected cell.
J. Virol., 1995, 69 (7) : 4053-4059.
- 169 - **SEIDLER E.**
The tetrazolium - Formazan system : design and histochemistry.
Prog. Histochem. Cytochem., 1991, 24, 1-86.
- 170 - **SHOBORG R.V. and CLEMENTS J.E.**
The Rev protein of Visna virus is localized to the nucleus of infected cells.
Virology, 1994, 202 : 485-490.
- 171 - **SIGURDARDOTTIR B. and THORMAR H.**
Isolation of viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi.
J. Infect. Dis., 1964, 114 : 55-60.
- 172 - **SIGURDSSON B., PALSSON P.A. and TRYGGVADOTTIR A.**
Transmission experiments with Maedi.
J. Infect. Dis., 1953 : 166-175.
- 173 - **SIGURDSSON B., THORMAR H. and PALSSON P.A.**
Cultivation of Visna virus in tissue culture.
Arch. Ges. Virusforsch., 1960, 10 : 368.
- 174 - **SIMMONS G., WILKINSON D., REEVES J.D., DITTMAR M.T., BEDDOWS S., WEBER J., CARNEGIE G., DESSELBERGER U., GRAY P.W., WEISS R.A. and CLAPHAM P.R.**
Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either CXCR4 or CCR5 as coreceptors for virus entry.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 8355-8360.

- 175 - **SMERDON S.J., JÄGER J., WANG L., KOHLSTAEDT L.A., CHIRINO A.J., FRIEDMAN J.M., RICE P.A. and STEITZ T.A.**
Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91 : 3911-3915.
- 176 - **SOMMADOSSI J.P. and MITSUYA H.**
Nucleosids analogs : similarities and differences.
Clin. Infect. Dis., 1993, 16 (suppl 1) : S7-S15.
- 177 - **SONIGO P.**
Variation virale, phylogénie et histoire naturelle du SIDA.
Médecine Thérapeutique, 1996, 2 (HS) : 6-11.
- 178 - **STEINKASSERER A., HARRISON R., BILLICH A., HAMMERSCHMID F., WERNER G., WOLFF A., PEICHL P., PALFI G., SCHNITZEL W., MLYNAR E. and ROSENWIRTH B.**
Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1 : interference with early and late events in HIV-1 replication.
J. Virol., 1995, 69 (2) : 814-824.
- 179 - **TAN G.T., WICKRAMASINGHE A., VERMA S., HUGHES S.H., PEZZUTO J.M., BABA M. and MOHAN P.**
Sulfonic acid polymers are potent inhibitors of HIV-1 induced cytopathogenicity and the reverse transcriptases of both HIV-1 and HIV-2.
Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1181 : 183-188.
- 180 - **TASTEMIN C.**
La piste encore incertaine des cytokines.
Le Journal du Sida, 1995, 80-81 : 20-24.
- 181 - **THORMAR H.**
A comparaisn of visna and maedi viruses, in physical, chemical and biological properties.
Res. Vet. Sci., 1965, 6 : 117-129.
- 182 - **THORMAR H., BALZARINI J., HOLY A., JINDRICH J., ROSENBERG I., DE SER Z., DESMYTER J. and DE CLERCQ ERIK**
Inhibition of Visna virus replication by 2',3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs
Antimicrob. Agents Chemother, 1993 : 2540-2544.
- 183 - **THORMAR H., GEORGSSON G., PALSSON P.A., BALZARINI J., NAESENS L., TORSTEINSDOTTIR S., DE CLERCQ E.**
Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine on visna virus infection in lambs : a model for *in vivo* testing of candidate anti-human immunodeficiency virus drugs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92 (8) : 3283-3287.
- 184 - **TILEY L.S., BROWN P.H., SY L., MAIZEL J.V., CLEMENTS J.E. and CULLEN B.R.**
Visna virus encodes a post transcriptional regulator of viral structural gene expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87 : 7497-7501.
- 185 - **TUBIANA R. et KATLAMA C.**
Les traitements antirétroviraux.
Méd. Mal. Infect., 1997, 27 : 23-30.
- 186 - **TUMMINO P.J., HARVEY P.J., McQUADE T., DOMAGALA J., GOGLIOTTI R., SANCHEZ J., SONG Y. and HUPE D.**
The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein zinc ejection activity of disulfide benzamides and benzisothiazolones : correlation with anti-HIV and virucidal activities.
Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 41 (2) : 394-400.

- 187 - **TURPIN J.A., TERPENING S., SCHAEFFER C.A., YU G., GLOVER C.J., FELSTED R.L., SAUSVILLE E.A. and RICE W.G.**
Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 zinc fingers prevent normal processing of Gag precursors and result in the release of noninfectious virus particles.
J. Virol., 1996, 70 (9) : 6180-6189.
- 188 - **VARMUS H.**
Retroviruses.
Science, 1988, 240 : 1427-1435.
- 189 - **WATANABE M., REINMANN K.A., DELONG P.A., LIU T., FISHER R.A. and LETVIN N.L.**
Effect of recombinant soluble CD4 in rhesus monkeys infected with SIV of macaques.
Nature, 1989, 337 : 267-270.
- 190 - **WEILAND F. and BRUNS M.**
Ultrastructural studies on maedi-visna virus.
Arch. Virol., 1980, 64 : 277-285.
- 191 - **WEISS L.**
Rôle des chémokines dans l'inhibition de la réplication du VIH.
Transcriptase, 1996, 42 : 9-11.
- 192 - **WEST M.L. and FAIRLIE D.P.**
Targeting HIV-1 protease : a test of drug design methodologies.
TIPS, 1995, 16 : 67-75.
- 193 - **WILD C.T., SHUGARS D.C., GREENWELL T.K., Mc DANAL C.B. and MATTHEWS T.J.**
Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91 : 9770-9774.
- 194 - **WITVROUW M., BALZARINI J., PANNECOUQUE C., JHAUMEER-LAULLO S., ESTE J.A., SCHOLS D., CHEREPANOV P., SCHMIT J.C., DEBYSER Z., VANDAMME A.M., DESMYTER J., RAMADAS S.R. and DE CLERCQ E.**
SRR-SB3, a disulfide-containing macrolide that inhibits a late stage of replicative cycle of human immunodeficiency virus.
Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 41 (2) : 262-268.
- 195 - **WITVROUW M., DESMYTER J. and DE CLERCQ E.**
Antiviral portrait series : 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses.
Antiviral Chem. Chemother., 1994, 5 (6) : 345-359.
- 196 - **WU Z., KAYMAN S.C., HONNEN W., REVESZ K., CHEN H., VIJH-WARRIER S., TILLEY S.A., Mc KEATING J., SHOTTON C. and PINTER A.**
Characterisation of neutralisation epitopes in the V_2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 : role of glycosylation in the correct folding of the V_1/V_2 domain.
J. Virol., 1995, 69 (4) : 2271-2278.
- 197 - **ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHER J., BOMMELI W. and PETERHANS E.**
An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small ruminant lentiviruses.
Zentralbl Veterinarmed B., 1994, 41 (10) : 662-669.
- 198 - **ZHOU W. and RESH M.D.**
Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein.
J. Virol., 1996, 70 (12) : 8540-8548.
- 199 - **ZINCK M.C. and JOHNSON L.K.**
Pathobiology of lentivirus infections in sheep and goats.
Vir. Res., 1994, 32 : 139-154.

ABBREVIATIONS

| | | | |
|-----------------------|--|------------|---|
| A..... | nucléotide à adénine | ddC..... | 2',3'-didésoxycytidine |
| ACTG..... | aids clinical trial groups | ddI..... | 2',3'-didésoxyinosine |
| ADN..... | acide désoxyribonucléique | ddN..... | didésoxynucléoside |
| α -APA..... | α -aminophénylacétamide | DICT 50... | dose infectante à 50% en culture tissulaire |
| AMM..... | autorisation de mise sur le marché | DMSO..... | diméthylsulfoxyde |
| ANP..... | nucléoside acyclique phosphoné | dNTP..... | désoxynucléoside triphosphate |
| ARN..... | acide ribonucléique | DO..... | densité optique |
| ARNm..... | acide ribonucléique messenger | DP..... | diphosphate |
| ARNt..... | acide ribonucléique de transfert | d4T..... | 2',3'-didésoxydéhydrothymidine |
| ARV..... | aids related virus | EBV..... | Epstein-Barr virus |
| ASLV..... | avian sarcoma-leukosis virus | ECP..... | effet cytopathogène |
| ATA..... | acide aurintricarboxylique | EDTA..... | ethylenediaminetetraacetic acid |
| ATP..... | adénosine triphosphate | EIAV..... | equine infectious anemia virus |
| ATU..... | autorisation temporaire d'utilisation | ELISA..... | enzyme-linked-immuno-sorbent-assay |
| AZT..... | 3'-azido-2',3'-didésoxythymidine = zidovudine | env..... | enveloppe |
| BHAP..... | bis(hétéroaryl)pipérazine | FeLV..... | feline leukemia virus |
| BIV..... | bovine immunodeficiency virus | FIV..... | feline immunodeficiency virus |
| BLV..... | bovine leukemia virus | g..... | gramme |
| C..... | nucléotide à cytosine | G..... | nucléotide à guanine |
| CA..... | protéine de capside | gag..... | group associated antigen |
| CAEV..... | caprine arthritis-encephalitis virus | gp..... | glycoprotéine |
| CC 50..... | concentration cytotoxique à 50% | HEPT..... | hydroxyéthoxyméthylphénylthiothymine |
| CC 90..... | concentration cytotoxique à 90% | HIV..... | human immunodeficiency virus |
| CDC..... | center for disease control | HSV..... | herpes simplex virus |
| CD4..... | cluster of differentiation 4 | HTLV..... | human T-cell leukemia virus |
| CD8..... | cluster of differentiation 8 | IDG..... | immunodiffusion sur gélose |
| CI 50..... | concentration inhibitrice à 50% | IFN..... | interféron |
| CI 90..... | concentration inhibitrice à 90% | IgG..... | immunoglobuline G |
| cm ² | centimètre carré | IL..... | interleukine |
| CMV..... | cytomégalovirus | IN..... | intégrase |
| coll. | collaborateur | IP..... | inhibiteur de protéase |
| CSP..... | code de la santé publique | IS..... | indice de sélectivité |
| CV..... | charge virale | kDa..... | kilodalton |
| CypA..... | cyclophiline A | l..... | litre |
| ddA..... | didésoxyadénosine | LAV..... | lymphadenopathy associated virus |
| dATP..... | désoxyadénosine triphosphate | LTR..... | long terminal repeat |
| | | MA..... | protéine de matrice |

| | | | |
|-----------------------|--|---------------------------|---|
| mg..... | milligramme | PR..... | protéase |
| Mg..... | magnésium | Pr160 ^{gag-pol} | polyprotéine précurseur issue des gènes gag et pol |
| MGG..... | May-Grünwald/Giemsa | Pr55 ^{gag} | polyprotéine précurseur issue du gène gag |
| MIP-1 α | macrophage inflammatory protein 1 α | PSS..... | polystyrènesulfonate |
| MIP-1 β | macrophage inflammatory protein 1 β | PVAS..... | polyvinylalcoholsulfate |
| mm ³ | millimètre cube | Rantes..... | regulation-upon-activation, normal T expressed and secreted |
| ml..... | millilitre | rev..... | regulator of expression of virion proteins |
| MLV..... | murine leukemia virus | RR..... | ribonucléotide réductase |
| mM..... | millimolaire | RRE..... | Rev-responsive element |
| Mn..... | manganèse | rs CD4..... | CD4 soluble recombinant |
| MP..... | monophosphate | RT..... | transcriptase inverse |
| MSV..... | murine sarcoma virus | SDF1..... | stroma cell-derived factor 1 |
| MTT..... | bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium | SI..... | syncytium inducing |
| μ l..... | microlitre | SIDA..... | syndrome d'immunodéficience acquise |
| μ m..... | micromètre | SIV..... | simian immunodeficiency virus |
| μ M..... | micromolaire | SU..... | glycoprotéine de surface |
| N..... | normale | SVF..... | sérum de veau foetal |
| NC..... | protéine de nucléocapside | T..... | nucléotide à thymine |
| NCAs..... | albumines chargées négativement | tat..... | trans activator of transcription |
| nef..... | negative regulator factor | TAR..... | Tat-responsive element |
| NLS..... | nuclear localization sequence | 3TC..... | 2',3'-didésoxythiacytidine |
| nm..... | nanomètre | TCID 50... | 50% tissue culture infectious dose |
| NNRTIs.... | inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse | TIBO..... | tétrahydroimidazobenzodiazépinone |
| NOBA..... | 3-nitrosobenzamide | TM..... | glycoprotéine transmembranaire |
| NSI..... | non syncytium inducing | TNF..... | tumor necrosis factor |
| p..... | protéine | TP..... | triphosphate |
| PAPS..... | polyacétalpolysulfate | TSAO..... | tert-butyl(diméthylsilyl)spiroaminoxathiole-dioxyde |
| PAS..... | polyanetholesulfonate | UV..... | ultra-violet |
| PAVAS..... | polyacrylicvinylalcoholsulfate | vif..... | viral infectivity factor |
| PBS..... | primer binding site | VIH..... | virus de l'immunodéficience humaine |
| PC..... | plexus choroïde | vpr..... | viral protein R |
| PCP..... | pneumocystose à <i>Pneumocystis carinii</i> | vpu..... | viral protein U |
| pdb..... | paire de bases | vpx..... | viral protein X |
| PM..... | poids moléculaire | VZV..... | virus du zona et de la varicelle |
| PMEA..... | 9-(2-phosphonométhoxyéthyl)adénine | | |
| pol..... | polymérase | | |
| pom..... | pivaloyloxyméthyl | | |

**TABLE DES TABLEAUX
ET DES FIGURES**

TABLEAUX

| | Pages |
|---|-------|
| <u>Tableau 1 :</u> classification des rétrovirus ; principaux représentants et pouvoir pathogène..... | 16 |
| <u>Tableau 2 :</u> produits, localisation et fonctions des gènes du VIH..... | 46 |
| <u>Tableau 3 :</u> délai jusqu'au sida et au décès en fonction de la mesure de la charge virale initiale..... | 58 |
| <u>Tableau 4 :</u> taux d'incidence (pour 1000 personnes-années) des principales pathologies opportunistes entre 1989 et 1994..... | 58 |
| <u>Tableau 5 :</u> second récepteur pour l'entrée du VIH dans les cellules et ligands naturels..... | 68 |
| <u>Tableau 6 :</u> principaux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse mis sur le marché ou en essais cliniques..... | 76 |
| <u>Tableau 7 :</u> mutations de la transcriptase inverse induites par les analogues nucléosidiques..... | 77 |
| <u>Tableau 8 :</u> principales classes d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse et exemples de molécules en développement..... | 79 |
| <u>Tableau 9 :</u> principaux inhibiteurs de la protéase du VIH..... | 94 |
| <u>Tableau 10 :</u> profil de mutation <i>in vivo</i> des inhibiteurs de la protéase du VIH..... | 94 |
| <u>Tableau 11 :</u> molécules à tester : préparation des solutions mères et de leur dilutions..... | 123 |
| <u>Tableaux 12 et 13 :</u> détermination du titre infectieux du MAEDI par la technique des dilutions limites selon la méthode de REED et MUENCH..... | 130 |
| <u>Tableau 14 :</u> tableau récapitulatif des valeurs de CC 50 et de CI 50 déterminées pour 6 molécules testées sur des cellules de PC infectées par le virus VISNA ou le virus MAEDI..... | 142 |
| <u>Tableau 15 :</u> comparaison de trois protocoles d'évaluation d'activité antivirale..... | 145 |

FIGURES

| | Pages |
|--|-------|
| Figure 1 : représentation schématique du virus VISNA-MAEDI..... | 21 |
| Figure 2 : organisation génomique du virus VISNA-MAEDI..... | 21 |
| Figure 3 : cycle de réplication des lentivirus..... | 26 |
| Figure 4 : attachement du virus VISNA-MAEDI à la surface d'une cellule..... | 27 |
| Figure 5 : entrée du VISNA-MAEDI dans une cellule par pinocytose..... | 27 |
| Figure 6 : virus VISNA-MAEDI intracellulaire..... | 27 |
| Figure 7 : bourgeonnement et libération d'un grand nombre de virus VISNA-MAEDI immatures à la surface d'une cellule infectée..... | 29 |
| Figure 8 : bourgeonnement et libération de virus VISNA-MAEDI..... | 29 |
| Figure 9 : virus VISNA-MAEDI mature avec capsidie pléomorphe..... | 29 |
| Figure 10 : intense inflammation de la substance blanche cérébrale avec d'importants infiltrats périvasculaires..... | 33 |
| Figure 11 : représentation schématique du VIH..... | 42 |
| Figure 12 : organisation génomique des virus VIH-1, VIH-2, et Visna-Maedi..... | 44 |
| Figure 13 : dynamique de la réplication du VIH <i>in vivo</i> | 51 |
| Figure 14 : signification de la charge virale et du taux de CD4..... | 58 |
| Figure 15 : structure générale de quelques composés polyanioniques..... | 63 |
| Figure 16 : structures de l'acide bétulinique et de quelques dérivés..... | 68 |
| Figure 17 : structure générale des bicyclams..... | 68 |
| Figure 18 : représentation linéaire de la transcriptase inverse..... | 70 |
| Figure 19 : représentation spatiale de la transcriptase inverse..... | 70 |
| Figure 20 : structures des nucléosides naturels et des analogues nucléosidiques utilisés en thérapeutique..... | 72 |
| Figure 21 : activation des 2',3'-didésoxynucléosides (ddN)..... | 77 |
| Figure 22 : structure générale des principaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse..... | 79 |
| Figure 23 : représentation linéaire de l'intégrase du VIH-1..... | 83 |
| Figure 24 : modèle d'intégration de l'ADN rétroviral..... | 83 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figure 25 : | production des protéines matures du VIH-1 à partir des gènes gag et pol..... | 92 |
| Figure 26 : | représentation des événements associés au clivage protéolytique du VIH par la protéase et à son inhibition..... | 92 |
| Figure 27 : | structures de quelques inhibiteurs de la protéase du VIH..... | 93 |
| Figure 28 : | structures de quelques inhibiteurs de la glycosylation..... | 99 |
| Figure 29 : | structures de quelques inhibiteurs de la NC p7..... | 99 |
| Figure 30 : | structure générale des oligonucléotides antisens..... | 106 |
| Figure 31 : | les cytokines et la réplication du VIH <i>in vitro</i> | 106 |
| Figure 32 : | culture de fibroblastes de PC au microscope optique (x 10)..... | 112 |
| Figure 33 : | culture de fibroblastes de PC au microscope optique (x 4) : tapis cellulaire à pleine confluence..... | 112 |
| Figure 34 : | structures chimiques du MTT et de son formazan..... | 118 |
| Figure 35 : | organisation de la microplaque de 96 puits à fond plat pour l'évaluation de l'activité antivirale..... | 121 |
| Figure 36 : | structures chimiques des molécules testées..... | 122 |
| Figure 37 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule AB 112 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 133 |
| Figure 38 : | activité antivirale de la molécule AB 112 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 133 |
| Figure 39 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule AB 112 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus MAEDI..... | 134 |
| Figure 40 : | activité antivirale de la molécule AB 112 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 134 |
| Figure 41 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule AB 86 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 135 |
| Figure 42 : | activité antivirale de la molécule AB 86 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 135 |
| Figure 43 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule AB 113 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 136 |
| Figure 44 : | activité antivirale de la molécule AB 113 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 136 |
| Figure 45 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule R1 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 137 |
| Figure 46 : | activité antivirale de la molécule R1 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 137 |
| Figure 47 : | courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule R1 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus MAEDI..... | 138 |

| | |
|--|-----|
| Figure 48 : activité antivirale de la molécule R1 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 138 |
| Figure 49 : courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule R2 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 139 |
| Figure 50 : activité antivirale de la molécule R2 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 139 |
| Figure 51 : courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule R2 sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus MAEDI..... | 140 |
| Figure 52 : activité antivirale de la molécule R2 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 140 |
| Figure 53 : courbe de viabilité cellulaire : effet de la molécule ddC sur les cellules de PC non infectées et infectées par le virus VISNA..... | 141 |
| Figure 54 : activité antivirale de la molécule ddC sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS..... | 141 |

TABLE DES MATIERES

| | Pages |
|---|-------|
| INTRODUCTION | 11 |
| PREMIERE PARTIE : LE VIRUS VISNA-MAEDI | 14 |
| I - HISTORIQUE | 15 |
| II - EPIDEMIOLOGIE | 17 |
| <u>II . 1 . Répartition géographique</u> | 17 |
| <u>II . 2 . Espèces affectées</u> | 17 |
| <u>II . 3 . Transmission</u> | 17 |
| III - VIROLOGIE | 18 |
| <u>III . 1 . Dimension et morphologie du virus</u> | 19 |
| <u>III . 2 . Ultrastructure</u> | 19 |
| <u>III . 2 . 1 . Nature de l'acide nucléique</u> | 19 |
| <u>III . 2 . 2 . Organisation génomique</u> | 20 |
| <u>III . 2 . 3 . Protéines et enzymes virales</u> | 22 |
| III . 2 . 3 . 1 . Protéines virales..... | 22 |
| III.2.3.1.1. Protéines d'enveloppe..... | 22 |
| III.2.3.1.2. Protéines de capsid..... | 23 |
| III.2.3.1.3. Autres polypeptides..... | 23 |
| III . 2 . 3 . 2 . Enzymes virales..... | 23 |
| <u>III . 3 . Propriétés physico-chimiques</u> | 24 |
| <u>III . 4 . Tropicité cellulaire</u> | 24 |
| <u>III . 5 . Cycle de multiplication du virus</u> | 25 |
| <u>III . 5 . 1 . Phase de reconnaissance, de fixation, et de pénétration du virus</u> | 25 |
| <u>III . 5 . 2 . Phase d'éclipse</u> | 25 |
| <u>III . 5 . 3 . Phase de production virale</u> | 28 |
| IV - LA MALADIE | 28 |
| <u>IV . 1 . L'incubation</u> | 28 |
| <u>IV . 2 . Le tableau clinique de la maladie</u> | 30 |

| | |
|--|----|
| <u>IV . 2 . 1 . La forme MAEDI</u> | 30 |
| <u>IV . 2 . 2 . La forme VISNA</u> | 30 |
| <u>IV . 3 . Anatomo-histopathologie</u> | 31 |
| <u>IV . 3 . 1 . La forme MAEDI</u> | 31 |
| IV . 3 . 1 . 1. Anatomo-pathologie..... | 31 |
| IV . 3 . 1 . 2. Histologie..... | 31 |
| <u>IV . 3 . 2 . La forme VISNA</u> | 31 |
| IV . 3 . 2 . 1. Anatomo-pathologie..... | 31 |
| IV . 3 . 2 . 2. Histologie..... | 32 |
| V - IMMUNOPATHOGENESE | 32 |
| VI - DIAGNOSTIC | 34 |
| <u>VI . 1 . Diagnostic clinique</u> | 34 |
| <u>VI . 2 . Diagnostic virologique</u> | 35 |
| <u>VI . 3 . Diagnostic sérologique</u> | 35 |
| <u>VI . 4 . Diagnostic histologique</u> | 36 |
| VII - TRAITEMENT | 36 |
| VIII - PROPHYLAXIE | 37 |
| DEUXIEME PARTIE : RAPPELS SUR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE et STRATEGIE ANTIRETROVIRALE | |
| | 38 |
| I - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE | 39 |
| <u>I . 1 . Découverte du virus</u> | 39 |
| <u>I . 2 . Diversité des souches de VIH</u> | 40 |
| <u>I . 3 . Virologie</u> | 41 |
| <u>I . 3 . 1 . Dimension et morphologie</u> | 41 |
| <u>I . 3 . 2 . Organisation génomique</u> | 43 |
| <u>I . 3 . 3 . Tropisme cellulaire</u> | 47 |
| <u>I . 3 . 4 . Mécanisme pathogénique</u> | 48 |
| <u>I . 3 . 5 . Cycle de réplication viral</u> | 49 |
| <u>I . 3 . 6 . Importance de la réplication virale</u> | 50 |
| <u>I . 3 . 7 . Variabilité génétique</u> | 50 |

| | |
|---|-----|
| II - STRATEGIE ANTIRETROVIRALE | 53 |
| <u>II . 1 . Méthode d'évaluation des antirétroviraux</u> | 53 |
| II . 1 . 1 . L'étude <i>in vitro</i> | 53 |
| II . 1 . 2 . L'étude <i>in vivo</i> chez l'animal..... | 54 |
| II . 1 . 3 . L'étude <i>in vivo</i> chez l'homme ou essais cliniques..... | 54 |
| <u>II . 2 . Critères d'évaluation de l'efficacité d'un antirétroviral chez l'homme</u> | 55 |
| <u>II . 3 . Médicaments autorisés en pratique clinique</u> | 59 |
| <u>II . 4 . Cibles des antirétroviraux dans le cycle de réplication viral</u> | 60 |
| II . 4 . 1 . Action au niveau de la fixation du virus..... | 60 |
| II . 4 . 1 . 1 . Le CD4 recombinant et ses dérivés..... | 60 |
| II . 4 . 1 . 2 . Les composés polyanioniques..... | 62 |
| II . 4 . 1 . 3 . L'immunothérapie..... | 64 |
| II . 4 . 2 . Action au niveau de l'étape de fusion/pénétration du virus..... | 65 |
| II . 4 . 3 . Action sur le processus de décapsidation..... | 67 |
| II . 4 . 4 . Action au niveau de la rétrotranscription..... | 69 |
| II . 4 . 4 . 1 . Rappels sur l'enzyme de transcription inverse..... | 69 |
| II . 4 . 4 . 2 . Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse..... | 71 |
| II . 4 . 4 . 3 . Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse..... | 78 |
| II . 4 . 5 . Action sur le transfert nucléaire de l'ADN viral..... | 80 |
| II . 4 . 6 . Action au niveau de l'intégration..... | 82 |
| II . 4 . 7 . Action au niveau de la transcription..... | 85 |
| II . 4 . 8 . Action au niveau de la traduction des ARNm en protéines..... | 86 |
| II . 4 . 9 . Action sur les phénomènes de maturation des protéines virales..... | 86 |
| II . 4 . 9 . 1 . L'inhibition de la protéase..... | 87 |
| II . 4 . 9 . 1 . 1 . Rappels sur la protéase du VIH..... | 87 |
| II . 4 . 9 . 1 . 2 . Les inhibiteurs de la protéase..... | 89 |
| II . 4 . 9 . 2 . L'inhibition de la glycosylation..... | 95 |
| II . 4 . 9 . 3 . L'inhibition de la myristylation..... | 95 |
| II . 4 . 10 . Action sur le processus de bourgeonnement..... | 96 |
| II . 4 . 11 . Autres niveaux d'action des drogues antirétrovirales..... | 97 |
| II . 4 . 11 . 1 . Action sur des protéines virales..... | 97 |
| II . 4 . 11 . 1 . 1 . La protéine NC p7..... | 97 |
| II . 4 . 11 . 1 . 2 . Les protéines de régulation..... | 100 |
| II . 4 . 11 . 2 . Action sur des facteurs de la cellule hôte..... | 100 |
| II . 4 . 11 . 2 . 1 . La ribonucléotide réductase..... | 100 |
| II . 4 . 11 . 2 . 1 . La cyclophiline A..... | 101 |
| II . 4 . 11 . 3 . La thérapie génique..... | 102 |
| II . 4 . 11 . 4 . L'immunomodulation..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| TROISIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL | 107 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES | 109 |
|---|-----|

| | |
|-------------------------------|-----|
| I - CULTURE CELLULAIRE | 109 |
|-------------------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>I. 1. Nature et origine des cellules</u> | 109 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>I. 2. Entretien des cultures</u> | 110 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>I. 2. 1. Le milieu de culture</u> | 110 |
|---|-----|

| | |
|-------------------------------------|-----|
| <u>I. 2. 2. Le repiquage</u> | 111 |
|-------------------------------------|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| I. 2. 2. 1. La trypsination | 111 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| I. 2. 2. 2. La remise en culture | 111 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>I. 3. Congélation - décongélation</u> | 113 |
|---|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| <u>I. 3. 1. Congélation</u> | 113 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|--------------------------------------|-----|
| <u>I. 3. 2. Décongélation</u> | 113 |
|--------------------------------------|-----|

| | |
|----------------------------------|-----|
| II - LE VIRUS VISNA-MAEDI | 114 |
|----------------------------------|-----|

| | |
|------------------------------|-----|
| <u>II. 1. Origine</u> | 114 |
|------------------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>II. 2. Constitution du pool viral</u> | 114 |
|---|-----|

| | |
|---------------------------------------|-----|
| <u>II. 3. Titrage du virus</u> | 115 |
|---------------------------------------|-----|

| | |
|----------------------------------|-----|
| <u>II. 3. 1. Principe</u> | 115 |
|----------------------------------|-----|

| | |
|-----------------------------------|-----|
| <u>II. 3. 2. Protocole</u> | 115 |
|-----------------------------------|-----|

| | |
|---------------------|-----|
| III - LE MTT | 117 |
|---------------------|-----|

| | |
|---------------------------------|-----|
| <u>III. 1. Structure</u> | 117 |
|---------------------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>III. 2. Propriétés physico-chimiques</u> | 117 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>III. 2. 1. Propriétés physiques</u> | 117 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>III. 2. 2. Propriétés chimiques</u> | 119 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>III. 3. Principe de la méthode colorimétrique au MTT</u> | 119 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>III. 4. Avantages de la méthode colorimétrique au MTT</u> | 119 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU MTT | 120 |
|---|-----|

| | |
|-----------------------------------|-----|
| <u>IV. 1. Les cellules</u> | 120 |
|-----------------------------------|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| <u>IV. 2. Les molécules</u> | 120 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|-------------------------------|-----|
| <u>IV. 3. Le virus</u> | 124 |
|-------------------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| IV . 3 . 1 . Souche VISNA K 796..... | 124 |
| IV . 3 . 2 . Souche MAEDI WLCI..... | 124 |
| IV . 4 . Incubation..... | 125 |
| IV . 5 . Coloration par la méthode au MTT..... | 125 |
| IV . 5 . 1 . Préparation de la solution de MTT..... | 125 |
| IV . 5 . 2 . Mode opératoire..... | 125 |
| IV . 6 . Lecture des densités optiques..... | 126 |
| IV . 7 . Détermination de la cytotoxicité des molécules testées..... | 126 |
| IV . 8 . Détermination de l'activité antivirale des molécules testées..... | 127 |

CHAPITRE SECOND : RESULTATS

| | |
|---|-----|
| I - CULTURE DU VIRUS..... | 129 |
| I . 1 . Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP)..... | 129 |
| I . 2 . Résultats du titrage..... | 129 |
| II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE..... | 131 |
| III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS-A-VIS DES SOUCHES VISNA ET MAEDI..... | 132 |
| IV - DISCUSSION..... | 143 |

CONCLUSION

148

BIBLIOGRAPHIE

155

ABREVIATIONS

172

TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

175

TABLE DES MATIERES

180

BON A IMPRIMER N° 19

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

BAUDOT Denis - STRATEGIE ANTIRETROVIRALE. EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE MOLECULES ORIGINALES SUR LE VIRUS VISNA-MAEDI.

Thèse Pharm. Limoges, 1997.

RESUME :

La recherche dans le domaine de la rétrovirologie a pris un essor considérable avec l'apparition chez l'homme du syndrome d'immunodéficience acquise, dont l'agent causal est un rétrovirus de la sous-famille des lentivirus : le VIH.

La réplication des rétrovirus au sein des cellules de l'organisme hôte est complexe et se décompose en nombreuses étapes que nous avons étudiées en tant que cibles potentielles d'action pour des drogues à visée antirétrovirale. La recherche active d'une thérapeutique efficace susceptible d'intervenir sur l'une de ces étapes génère une quantité considérable de molécules dont il faut évaluer l'activité. La grande majorité d'entre elles s'avère dénuée d'efficacité et souligne l'intérêt d'une présélection des composés susceptibles de présenter une activité anti-VIH.

Le lentivirus ovin VISNA-MAEDI, non pathogène pour l'homme, présente de nombreuses caractéristiques communes avec le VIH, avec en particulier des sensibilités à l'inhibition comparables *in vitro*. Il nous a servi de modèle expérimental pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antivirale de cinq molécules originales selon une méthode colorimétrique simple et rapide utilisant un sel de tétrazolium (MTT).

MOTS-CLES :

- antirétroviraux
 - MTT
 - VIH
 - virus VISNA-MAEDI
-

JURY :

- Président : Madame C. BOSGIRAUD, Professeur
- Juges : Madame S. DELEBASSEE, Maître de Conférences
- Monsieur A. ORABONA, Pharmacien
- Madame S. ROGEZ, Praticien Hospitalier