

Université de Montréal

ETUDE DES INHIBITEURS D'ENTREE DE CXCR4;
CORECEPTEUR D'ENTREE DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE.

Par Ludovic Dorel

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

5 décembre 2008

© Ludovic Dorel (2008)

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

ETUDE DES INHIBITEURS D'ENTREE DE CXCR4;
CORECEPTEUR D'ENTREE DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE.

Présenté par :
Ludovic Dorel

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Normand Brisson
Président-rapporteur

Dr Nikolaus Heveker
Directeur de recherche

Dr Hugo Soudeyns
Membre du jury

RÉSUMÉ

L'entrée virale du VIH-1 dans ses cellules cibles constitue une cible thérapeutique de choix. À l'heure actuelle, un inhibiteur de fusion et un inhibiteur ciblant le corécepteur CCR5 sont utilisés en thérapie. Dans notre étude, notre objectif était d'évaluer le profil antiviral et fonctionnel de plusieurs types moléculaires envisagés comme inhibiteurs d'entrée du corécepteur CXCR4, soient : 1) de dérivés peptidiques mimant des portions du récepteur 2) de dérivés peptidiques issus du ligand naturel de CXCR4, le SDF-1 et 3) de dérivés du puissant inhibiteur de faible poids moléculaire, le T140.

Notre recherche se concentrait sur la mise au point de molécules capables d'inhiber l'entrée du VIH en ciblant sélectivement le corécepteur CXCR4 tout en conservant les fonctions naturelles de ce dernier. Parmi les molécules testées, certaines possèdent un grand potentiel dans le développement de nouveaux médicaments antirétroviraux.

Mots-clés : entrée virale, VIH, inhibiteurs d'entrées, corécepteur CXCR4.

ABSTRACT

HIV entry into target cell is one of the main therapeutic goals in AIDS research. One fusion inhibitor is actually used as therapeutics and one more entry inhibitor targeting the CCR5 coreceptor was approved recently. The discovery of inhibitors targeting the second HIV coreceptor CXCR4 with high antiviral power versus low interference with natural functions of CXCR4 represents a crucial issue in AIDS research.

In our study, antiviral properties and functional effect of different kinds of molecules were tested: 1) peptides derivative mimicking CXCR4 domains 2) SDF-1 derivative peptides and 3) T140 (a low molecular weight inhibitor) derivative molecules. These molecules were investigated in HIV infection and cellular migration.

The main goal of our study was to determine molecules having great antiviral properties versus low interference on chemotactic response induced by the natural ligand of CXCR4 (SDF-1). Within the panel of molecules tested, some have great potential to become lead compounds for inhibition of viral entry through CXCR4.

Keywords: viral entry, HIV, entry inhibitors, CXCR4 coreceptor.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABBREVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii

1 INTRODUCTION	1
1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1	2
1.1.1 STRUCTURE	
1.1.2 PROTÉINES VIRALES	7
1.1.3 CYCLE DE RÉPLICATION	8
1.1.4 LES ANTIVIRAUX DÉVELOPPÉS	11
1.1.4.1 INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE	11
1.1.4.2 INHIBITEURS DE LA PROTÉASE VIRAL	12
1.1.4.3 INHIBITEURS DE L'INTEGRASE	12
1.1.4.4 ANTICORPS	12
1.1.4.5 LES INHIBITEURS D'ENTRÉE DU VIRUS	13
1.1.4.5.1 INHIBITEURS DE FUSION	13
1.1.4.5.2 INHIBITEURS DE CORÉCEPTEURS	13
1.1.4.5.3 INHIBITEURS DE CCR5	14
1.1.4.5.4 INHIBITEURS DE CXCR4	15
2 QUESTION RELATIVE À UNE STRATÉGIE VISANT CXCR4 COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE	16
2.1 CXCR4	17
2.1.1 GÉNÉRALITÉS ET EXPRESSION DE CXCR4	17
2.1.2 DIMÉRISATION DE CXCR4	19
2.1.3 MODULATION CONFORMATIONNELLE DE CXCR4	19
2.1.4 MÉCANISME DE LA LIAISON DU SDF-1 À CXCR4	21
2.1.5 SIGNALISATION INDUITE PAR CXCR4	23
2.2 DE L'ATTACHEMENT DU VIRUS A L'IMPLICATION DE CXCR4 DANS LA PATHOGENÈSE	24

2.2.1	ATTACHEMENT DU VIRUS PAR DC-SIGN ET L'INTÉGRINE $\alpha 4\beta 7$	24
2.2.2	ENTRÉE DU VIRUS	25
2.2.2.1	LE RECEPTEUR CD4	25
2.2.2.2	IMPORTANCE DES CORECEPTEURS CXCR4 ET CCR5	25
2.2.3	IMPLICATION DE CXCR4 DANS LA PATHOGENÈSE VIRALE	28
2.2.3.1	ACTIVATION DES MAP KINASE PAR LE VIRUS	28
2.2.3.2	INDUCTION DE LA MIGRATION ET DU RECRUTEMENT CELLULAIRE PAR LE VIRUS VIA LES CORÉCEPTEURS	29
2.2.3.3	RÉGULATION DE L'APOPTOSE DE LA CELLULE HOTE PAR LE VIRUS VIA LES CORÉCEPTEURS	29
2.3	INHIBITEURS DE CXCR4 EN DÉVELOPPEMENT	30
2.3.1	PEPTIDES DÉRIVÉS DES SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES DE CXCR4	30
2.3.2	PEPTIDES DÉRIVÉS DE LA CHIMIOKINE SDF-1	31
2.3.3	INHIBITEURS NON PEPTIDIQUES DE FAIBLES POIDS MOLÉCULAIRE	32
2.3.3.1	DÉRIVÉS DU T22	32
2.3.3.2	AMD 3100	35
2.3.3.3	DÉRIVÉS DU T140	37
2.4	VERS DES INHIBITEURS D'ENTRÉE DE NATURE ALLOSTÉRIQUE	39
2.4.1	INHIBITEURS DE CCR5 ALLOSTÉRIQUES	39
2.4.2	VERS DES INHIBITEURS DE CXCR4 ALLOSTÉRIQUES	43
2.4.2.1	EXEMPLE D'UN DÉRIVÉ DU SDF-1	43
2.4.2.2	UNE PISTE SUIVIE: LES DÉRIVÉS DU T140	43
3	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	45
4	MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
4.1	CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTIONS ET PLASMIDES	50
4.2	CONSTRUCTION DES MUTANTS DE CXCR4	50
4.3	CYTOMÉTRIE DE FLUX	53
4.4	PRÉPARATION DU PLASMIDE D'EXPRESSION PORTANT LE PROVIRUS DU VIH-1 _{89.6}	53
4.4.1	PRODUCTION DES PARTICULES VIRALES DU VIH-1 _{89.6}	53
4.4.2	TEST D'INHIBITION DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 _{89.6}	54
4.5	ESSAI DE MIGRATION CELLULAIRE INDUITE PAR LE COUPLE CXCR4/SDF-1	54
4.6	ESSAI DE LIAISON À CXCR4	55

5	RÉSULTATS DE L'INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4	57
5.1	DÉRIVÉS DU T140	58
5.1.1	EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS DU T140	58
5.1.1.1	TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS DU T140	58
5.1.1.2	TEST DE L'INTERFÉRENCE SUR LA CHIMIOTAXIE DES DÉRIVÉS DU T140	61
5.1.2	INTERACTION DES DÉRIVÉS DU T140 AVEC CXCR4	64
5.1.2.1	COMPÉTITION ENTRE LES DÉRIVÉS DU T140 ET LE RADIOLIGAND ¹²⁵ I-SDF-1	64
5.1.2.2	RÉSIDUS CRITIQUES DE CXCR4 POUR L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DU T140	66
5.2	DÉRIVÉS DU SDF-1	68
5.2.1	EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS DU SDF-1	68
5.2.1.1	TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS DU SDF-1	68
5.2.1.2	TEST DE L'INTERFÉRENCE SUR LA CHIMIOTAXIE DES DÉRIVÉS DU SDF-1	70
5.3	DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4	72
5.3.1	EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4	75
5.3.1.1	TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4	75
6	DISCUSSION	81
6.1	INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS DU T140	82
6.2	INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DU SDF-1	89
6.3	INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4	91
7	CONCLUSION & PERSPECTIVES	94
8	BIBLIOGRAPHIE	98
9	ANNEXE	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Activités antivirales et compétitives de la liaison du SDF-1 à CXCR4 des dérivés du T140.	44
Tableau 2: Comparaison des activités antivirales des dérivés du T140 issues de la littérature et expérimentales.	60
Tableau 3 : Activités anti-chimiotactiques des dérivés du T140.	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Évolution du nombre de lymphocytes T CD4+ et de la charge virale chez une personne infectée par le VIH.	4
Figure 1.2 : Représentation schématique du VIH.	6
Figure 1.3 : Cycle de réplication du VIH.	10
Figure 2.1 : Fonctions multiples de CXCR4.	18
Figure 2.2 : Mécanisme de liaison du SDF-1 à CXCR4.	22
Figure 2.3 : Entrée du VIH dans les cellules cibles.	27
Figure 2.4 : Structure moléculaire du T22.	34
Figure 2.5 : Structure moléculaire du T140.	34
Figure 2.6: Activité mobilisatrice des cellules souches de la moelle osseuse par le bicyclame AMD3100.	36
Figure 2.7 : Développement de dérivés du T140.	38
Figure 2.8 : Structure moléculaire des inhibiteurs allostériques de CCR5.	41
Figure 4.1 : Mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel.	52
Figure 5.1 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés du T140.	59
Figure 5.2 : Inhibition de la migration cellulaire par les dérivés du T140.	62
Figure 5.3 : Inhibition de la liaison du ¹²⁵I-SDF-1 à CXCR4 par les dérivés du T140.	65
Figure 5.4: Activité antivirale du T140 sur la fonction coréceptrice de CXCR4 sauvage et mutant.	67
Figure 5.5 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés de la chimiokine SDF-1.	69
Figure 5.6 : Inhibition de la migration cellulaire par un dérivé du SDF-1.	71
Figure 5.7 : Mécanisme hypothétique d'inactivation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) par un peptide mimant une portion transmembranaire.	72

Figure 5.8 : Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4 et séquence des dérivés peptidiques des boucles extracellulaires (rouge) et du quatrième segment transmembranaire (vert).	74
Figure 5.9 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés peptidiques du quatrième segment transmembranaire de CXCR4.	76
Figure 5.10 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés peptidiques de l'extrémité N-terminal de CXCR4.	78
Figure 5.11 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés peptidiques des boucles extracellulaires de CXCR4.	80
Figure 6.1 : a) Activité antivirale versus anti-chimiotactique des dérivés du T140.	85
Figure 6.2 : b) Activité antivirale versus anti-chimiotactique des dérivés du T140.	85
Figure 6.3 : Liaison du T140 à CXCR4.	88

LISTE DES ABBREVIATIONS

A	Alanine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
siARN	Small interfering Acide Ribonucléique
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CA	Capside
CPRG	Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
C-terminale	Carboxy-terminale
D	Acide Aspartique
E	Acide Glutamique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ENV	Enveloppe
F	Phénylalanine
gp	Glycoprotéine
G	Glycine
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GTP	Guanosine Triphosphate
HEK293	Human Embryonic Kidney
IC50 50%	Inhibitory Concentration
INT	Intégrase
IP3	Inositol Triphosphate
JAK	Janus Kinase
K	Lysine
L	Leucine
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
N	Asparagine
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NC	Nucléocapside
NK	Natural Killer Cell
NOD	Non-Obese
N-terminale	Amino-terminale
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate saline buffer
PEI	Polyéthylèneimine
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis Toxin
PRO	Protéase
Q	Glutamine

R	Arginine
RANTES secreted	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RLuc	Renilla Luciférase
RT	Transcriptase inverse
S	Sérine
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SIDA	Syndrôme d'immnodéficience acquise
Src	Steroid receptor coactivator
SU	Protéine de surface
SVF	Sérum de veau foetal
Tat	Transactivator of transcription
TM	Transmembaranaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Y	Tyrosine
YFP	Yellow Fluorescent Protein

REMERCIEMENTS

Merci à mes collègues : Stéphanie Gravelle, Geneviève St Onge, Irina Kalatskaya, Sébastien Janvier. Un merci tout particulier à Yamina A. Berchiche.

Un très grand merci à mon directeur de recherche Nikolaus Heveker pour son mentorat précieux et édifiant.

Merci à mon colocataire et ami Arnaud Duval.

Merci à Benoît.

Merci à ma Famille, mes Amis, aux Autres.

Merci à l'Autre.

Je juge les actes à l'aune de la jouissance qu'ils donnent. L'extase voluptueuse est le but souverain de l'existence.

Amélie Nothomb.

1 INTRODUCTION

1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1

Le syndrome de l'immunodéficience humaine (SIDA) est considéré à l'heure actuelle comme une pandémie ayant tué plus de 25 millions de personnes depuis sa découverte en 1981. En 1983, l'équipe du professeur Montagnier parvient à isoler un petit rétrovirus complexe, le VIH : agent étiologique de la maladie. L'infection par ce rétrovirus mène à une déplétion du système immunitaire puisqu'il provoque la disparition des cellules immunitaires et les personnes immunodéficientes meurent à la suite d'une maladie opportuniste, qui en temps normal, serait jugulée par un organisme sain. Selon le rapport 2008 d'ONUSIDA, pour la seule année 2007, 33 millions de personnes vivent avec le VIH, 2.7 millions de personnes ont été infectés par le virus, et 2 millions de personnes sont décédées de causes liées au VIH.

L'évolution de la maladie est corrélée à l'évolution de souches virales utilisant exclusivement ou simultanément les corécepteurs CXCR4 et CCR5 pour leur étape d'entrée dans les cellules cibles. On parle alors de souches X4 (souches induisant des syncytia sur des lignées cellulaires) R5 (souches n'induisant pas de syncytia sur ces mêmes lignées) ou R5X4 [1]. Les premiers stades de l'infection voient apparaître des virus R5, puis les stades avancés et finaux respectivement des souches R5X4 puis X4 [1-4].

L'évolution du tropisme viral vers des souches X4 permettrait au virus d'attaquer les lymphocytes T CD4+ naïfs, n'exprimant que le récepteur CXCR4, et d'empêcher ainsi le renouvellement des différentes populations de lymphocytes T CD4+ : population cellulaire inductrice de la réponse immunitaire [4, 5].

Le SIDA correspond à la dernière étape de l'infection par le virus. Après des premiers signes ressemblant à ceux d'une infection grippale durant la primo-infection, des troubles majeures apparaissent souvent tels qu'un zona induit par la résurgence du VZV, la tuberculose ou d'une infection fongique induites par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Candida albicans*. L'individu infecté voit alors une diminution considérable du nombre de ses lymphocytes T CD4+ corrélée à une augmentation de sa charge virale [6] (Figure 1.1).

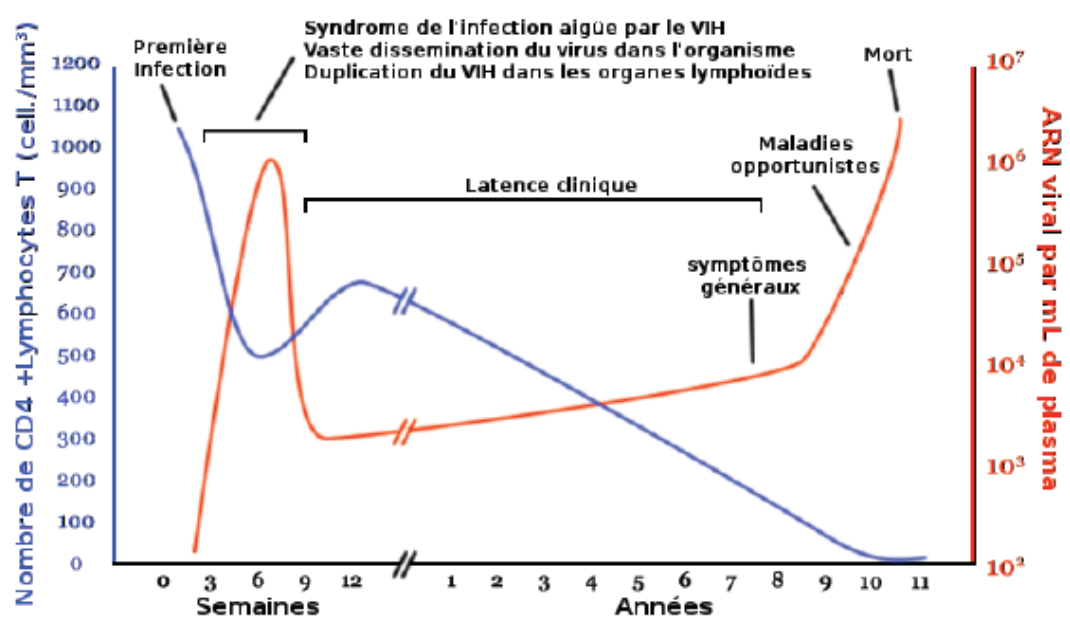


Figure 1.1 Évolution du nombre de lymphocytes T CD4+ et de la charge virale chez une personne infectée par le VIH [7].

1.1.1 STRUCTURE

Le VIH est une petite sphère (diamètre de 145 nm) munie d'une bicouche lipidique riche en sphingomyéline et cholestérol provenant de la membrane de la cellule productrice. La présence du cholestérol viral semble importante pour l'infectivité du virus [8-10]. Le virus expose à sa surface des protéines virales qui sont la gp120 et la gp41 issues du clivage protéolytique du précurseur gp160 Env.

A l'intérieur du virus se trouve la capsid virale constituée des protéines de structure issues du clivage protéolytique de pr55^{Gag}. Les protéines de la matrice (MA) tapissent la face interne de la bicouche lipidique du virus. Le génome viral est présent au sein d'un noyau formé de la capsid (CA). Dans le noyau, on trouve deux copies d'ARN viral au sein du complexe ribonucléo-protéique (RNP). L'ARN viral est recouvert des protéines de la nucléocapsid (NC) qui le protègent (Figure 1.2).

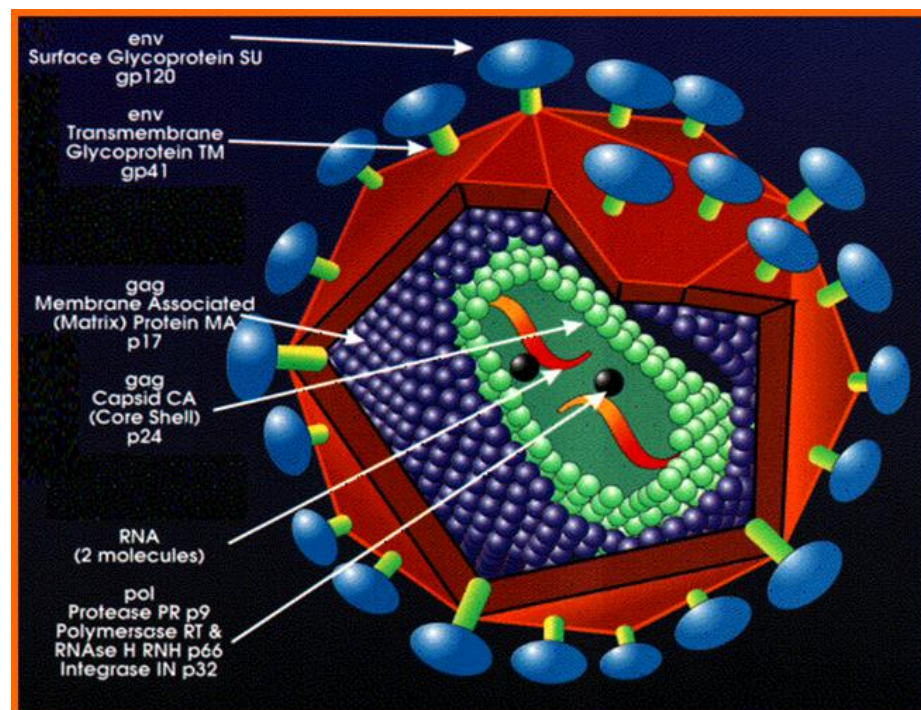


Figure 1.2 : Représentation schématique du VIH. Le virus est enveloppé d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe TM et SU. À l'intérieur du virus, se trouvent la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapside (NC), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN), la protéase (PR) et l'ARN génomique viral [11].

1.1.2 PROTÉINES VIRALES

L'ensemble de l'information nécessaire à la synthèse de toutes les protéines du virus est contenu dans l'ARN génomique simple brin de 9 kilobases et d'orientation positive qui code pour :

- 1) Les protéines de structure qui composent la charpente de la particule virale : la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC), p6, p2 et p1.
- 2) Les enzymes : la protéase (PR), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT).
- 3) Les protéines d'enveloppe : la gp41 (TM) et la gp120 (SU) exposées à la surface du virus et permettant l'entrée dans la cellule hôte.
- 4) Les protéines régulatrices de la transcription des gènes viraux : Tat et Rev.
- 5) Les protéines accessoires : Vpr, Nef, Vpu et Vif possédant des activités importantes pour le virus.

1.1.3 CYCLE DE RÉPLICATION

Le VIH-1 expose à sa surface des glycoprotéines d'enveloppe, soient la gp120 et la gp41 permettant l'accrochement puis la fusion dans la cellule hôte. La gp120 interagit avec son récepteur CD4 exprimé à la surface des cellules cibles [12-15]. L'interaction de la gp120 avec ses corécepteurs CXCR4 et CCR5 (*le travail de ce mémoire de maîtrise porte sur cette étape d'entrée du virus envisagée comme une cible thérapeutique*), induit un changement conformationnel de cette dernière qui conduit à la libération du peptide gp41 qui assure la fusion entre l'enveloppe du virus et de la cellule [16-20]. La capsid est relarguée à l'intérieur du cytoplasme de la cellule cible et le génome d'ARN décapsidé. La transcriptase inverse génère de l'ADN viral double-brin à partir de l'ARN génomique. Cet ADN viral est transporté au noyau cellulaire au sein d'un complexe multiprotéique, le complexe de préintégration (PIC). L'ADN viral peut alors s'intégrer dans le génome cellulaire grâce à l'intégrase (IN) et forme le provirus. Sous le contrôle des promoteurs viraux, la transcription des gènes du virus peut débiter. Cette étape est finement régulée par la protéine Tat et par des facteurs de transcription cellulaires. La protéine Rev contrôle l'export nucléaire des ARN messagers viraux et génomiques qui sont par la suite traduits.

Toutes les protéines de structure du virus sont synthétisées d'un seul coup en un long complexe précurseur : le pr55^{Gag}. Lors de la synthèse d'une nouvelle particule virale, plus de 5000 molécules de pr55^{Gag} multimérisent. La matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC), p1, p2 et p6 correspondent aux différents sous-domaines composant pr55^{Gag} et participent à l'assemblage de la nouvelle particule virale. Les enzymes viraux sont également synthétisées sous forme d'un précurseur : le pr160^{Gag-pol} qui interagit avec le pr55^{Gag}. C'est par l'action du pr55^{Gag} que deux copies d'ARN sont encapsidées dans la nouvelle particule virale. Les protéines d'enveloppe gp41 et gp120 sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, sous forme du précurseur Env. Env

emprunte la voie de sécrétion cellulaire et est recrutée au sein des complexes d'assemblage. Les nouvelles particules virales immatures bourgeonnent de la membrane plasmique puis sont relâchées dans le milieu extracellulaire (Figure 1.3). Pendant la relâche, les précurseurs pr55^{Gag} et pr160^{Gag-pol} subissent un clivage protéolytique par la protéase et génèrent la MA, CA, NC, p6, p1, p2, IN et la RT. Le précurseur Env est clivé par des protéases cellulaires. La maturation des protéines virales aboutit à des virus matures capables d'infecter d'autres cellules cibles [21, 22].

L'étude moléculaire des différentes étapes du cycle de réplication du virus stimule fortement la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

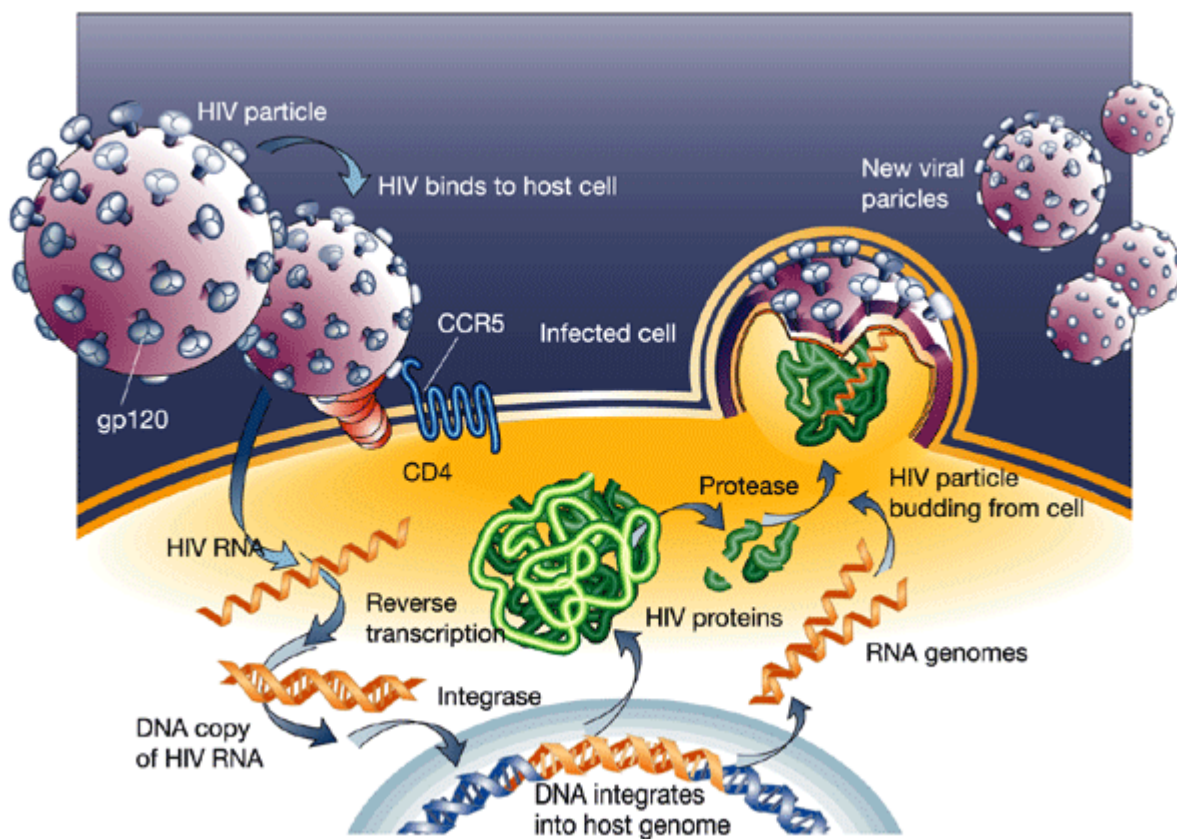


Figure 1.3 : Cycle de répliation du VIH. Tiré de Weiss & al. [23].

La vaccination qui représente un domaine considérable dans la recherche anti-VIH ne sera pas détaillée ici, elle pourrait néanmoins constituer l'étape future d'éradication de la maladie. Plusieurs médicaments antirétroviraux ont été mis au point pour contenir la réplication virale et retarder l'avancée de la maladie.

1.1.4 LES ANTIVIRAUX DÉVELOPPÉS

Plusieurs médicaments antiviraux ciblant le virus ont été développés afin de permettre de stabiliser l'état de santé des personnes infectées. Des inhibiteurs de la RT et de la protéase sont les exemples les plus connus. Cependant, la RT possède intrinsèquement un pouvoir mutateur énorme qui lui permet sans cesse de créer de nouvelles formes virales insensibles aux inhibiteurs employés. Les traitements antirétroviraux actuels consistent en la combinaison de plusieurs drogues ciblant diverses enzymes virales afin d'augmenter l'inhibition de la réplication virale et d'ainsi réduire le nombre de virus mutants [24-27]. Bien que ces traitements permettent d'allonger l'espérance de vie des patients infectés, leur vie est profondément affectée par les multiples effets secondaires inhérents aux drogues utilisées. La recherche actuelle vise à découvrir des inhibiteurs étant le moins toxiques possible pour l'organisme.

1.1.4.1 INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE

La transcriptase inverse (RT) présente une activité essentielle pour la réplication virale, elle transforme l'ARN en ADN bicaténaire (rétrotranscription) qui sera intégré au génome de la cellule infectée. La RT utilise les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) présent dans la cellule hôte pour synthétiser l'ADN viral. Des analogues de nucléotides triphosphorylés mais dépourvus du groupement hydroxyl en 3' sont devenus de puissants antirétroviraux puisqu'ils provoquent la terminaison prématurée de la

molécule d'ADN naissante. Cette classe de molécules est représentée par les NRTIs ou NtRTIs (Nucleoside/Nucléotide Reverse Transcriptase Inhibitors). Parmi ces analogues, on retrouve l'AZT et plus d'une quinzaine d'autres molécules actuellement utilisées ou en phase d'essai [28]. La deuxième classe d'antirétroviraux ciblant la RT sont les NNRTI (Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) comprenant des molécules utilisées en clinique et d'autres en phase d'essai. Les NNRTI sont des antirétroviraux allostériques qui inhibent la polymérisation de l'ADN viral en se fixant sur un site différent du site catalytique de l'enzyme [29, 30].

1.1.4.2 INHIBITEURS DE LA PROTÉASE VIRAL

Les inhibiteurs de protéase (PIs) sont des analogues peptidiques qui agissent en mimant une liaison phénylalanine-proline. En se fixant dans le site actif de la protéase, ils agissent comme inhibiteurs compétitifs du substrat naturel de l'enzyme [31, 32].

1.1.4.3 INHIBITEURS DE L'INTEGRASE

L'intégrase est une enzyme qui permet d'intégrer l'ADN proviral au génome de l'hôte. Cette enzyme a rapidement constitué une cible de choix dans la mesure où elle ne possède pas d'équivalent chez l'homme. Il existe trois inhibiteurs d'intégrase : le raltégravir et le elvitégravir tout deux commercialisés et le MK-2048 en phase d'essai clinique II [33-36].

1.1.4.4 ANTICORPS

Des anticorps ciblant les récepteurs d'entrée du virus ont vu le jour telles que les molécules PRO-542 et PRO-140. Le PRO-140 est un anticorps monoclonal dirigé contre le corécepteur CCR5 [37]. Le PRO-542 est une protéine

recombinante d'immunoglobuline humaine possédant les deux domaines distaux de CD4, pouvant neutraliser plusieurs souches virales *in vitro* et de réduisant la charge virale sur un modèle murin. Les essais cliniques montrent que la molécule est bien tolérée chez l'homme avec une demi-vie relativement longue de 3 à 4 jours [13, 38-41].

Certains anticorps ciblent l'enveloppe virale. Les anticorps B12 et 2G12 sont dirigés contre la gp120 et l'anticorps 2F5 est dirigé contre la gp41 et montrent une inhibition de l'infection *in vitro* sur plusieurs clades virales [42-44].

1.1.4.5 LES INHIBITEURS D'ENTRÉE DU VIRUS

1.1.4.5.1 INHIBITEURS DE FUSION

Le T20 (Enfuvirtide) est un inhibiteur de fusion peptidique. Le T20 se fixe sur la protéine gp41 et l'empêche de remplir sa fonction de fusion entre les membranes virales et cellulaires. Utilisé en injection sous-cutanée, le T20 assure une forte réduction de la charge virale [45, 46]. Le T20 a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis en mars 2003 et est utilisé en combinaison avec d'autres antirétroviraux. Le coût de fabrication du T20 demeure très élevé.

1.1.4.5.2 INHIBITEURS DE CORÉCEPTEURS

Il existe deux corécepteurs majeurs à l'entrée du VIH, il s'agit des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 [16, 47]. Les ligands respectifs de ces deux récepteurs sont CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), et CCL5 (RANTES) pour CCR5 et SDF-1 pour CXCR4.

1.1.4.5.3 INHIBITEURS DE CCR5

Plusieurs inhibiteurs du récepteur CCR5 ont pu voir le jour rapidement puisque ce récepteur ne constitue pas une cible antirétrovirale délicate. En effet, la mutation CCR5 Δ 32 provoquant un récepteur inactif est présente chez plusieurs individus caucasiens sains [48-50]. Le TAK-779 est le premier inhibiteur de CCR5, se liant dans une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III et VII du récepteur [51]. Il est de nature non-peptidique, de faible poids moléculaire, empêche la liaison de la chimiokine RANTES au récepteur et bloque la réponse calcique à des concentrations nanomolaires (1.6 à 3.7 nM). Il est actif à la fois sur des souches de laboratoire et sur des souches issues de patients infectés mais sans effet sur les souches X4. Cette drogue n'a pu voir le jour en thérapie étant donné les complications engendrées dues à son administration. Le TAK-220, qui inhibe la liaison à la fois de RANTES et MIP 1 α (mais pas MIP-1 β) est en phase pré-clinique d'essai [52].

D'autres inhibiteurs, les oximes-pipéridines tels que les molécules SCH-C et SCH-D (Société Schering-Plough) bloquent également l'entrée par CCR5. Le site de fixation se situe dans une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III et VII. Cette molécule aurait un mécanisme d'action double : elle agirait par blocage stérique de la liaison de la gp120 et également par modulation de la conformation des domaines extracellulaires du récepteur. Les premiers essais cliniques ont montré une réduction de la charge virale d'un demi-logarithme chez une dizaine de patients. Le SCH-C (SCH 351125) est biodisponible oralement mais une administration prolongée à forte dose a révélé des problèmes cardiaques [53, 54]. Le SCH-D, quant à lui, présente une activité antivirale plus forte que le SCH-C (0.1 à 0.3 nM) et est actuellement en essai clinique. La molécule UK-427,857 ou Maraviroc commercialisée par Pfizer est un inhibiteur de CCR5 non compétitif des chimiokines [55]. Le composé est administré par voie orale et est bien toléré par les individus sains [56, 57].

La molécule PRO-140 est un anticorps anti-CCR5 de souris humanisée bloquant un spectre assez large de souches *in vitro* sur des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques et également *in vivo* sur des souris SCID. Cette molécule est entrée en phase d'essai clinique II en février 2008 [37].

1.1.4.5.4 INHIBITEURS DE CXCR4

Les souches virales qui émergent plus tard au cours de la maladie chez 40 % des individus infectés utilisent le corécepteur CXCR4. Le ciblage de CXCR4 à l'aide d'inhibiteur est un problème beaucoup plus épineux. On a en effet observé que des souris déficientes pour CXCR4 et pour son ligand naturel, le SDF-1, présentent des défauts d'embryogenèse tels que des déficits cardiaques, neurologiques et hématopoïétiques. Les inhibiteurs d'entrée de CXCR4 doivent impérativement inhiber la fonction coréceptrice du VIH sans interférer avec les fonctions naturelles du récepteur. Parmi les inhibiteurs de CXCR4 existant, aucun ne répond à ce critère. Un cas représentatif est celui de l'AMD 3100, puissant inhibiteur d'entrée par CXCR4 et abandonné en tant qu'agent antirétroviral vu son fort pouvoir de compétition avec le SDF-1 [58-60].

La mise au point d'inhibiteurs de CXCR4 répondant aux conditions évoquées précédemment constitue donc une nécessité et un défi qui fait l'objet de ce mémoire de maîtrise.

**2 QUESTION RELATIVE À UNE
STRATÉGIE VISANT CXCR4
COMME CIBLE
THÉRAPEUTIQUE**

2.1 CXCR4

2.1.1 GÉNÉRALITÉS ET EXPRESSION DE CXCR4

CXCR4 appartient à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs). Initialement appelé "fusine", il est le premier récepteur de chimiokine identifié comme étant un corécepteur à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles [16]. Le ligand naturel de CXCR4 est la chimiokine SDF-1 (ou CXCL12) [61]. CXCR4 comporte 352 acides aminés et est exprimé à la surface d'une grande variété de cellules telles que les neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B et leurs précurseurs, les cellules progénitrices CD34+ du sang et de la moelle osseuse ainsi que les cellules dendritiques dérivées du sang. Il est présent à la surface des cellules de Langerhans, des macrophages, et des cellules T matures et immatures du thymus [62-64]. Le récepteur est également exprimé à la surface des cellules endothéliales vasculaires, des neurones du système nerveux central et périphérique, des cellules de la microglie et des astrocytes. (Figure 2.1) [65, 66].

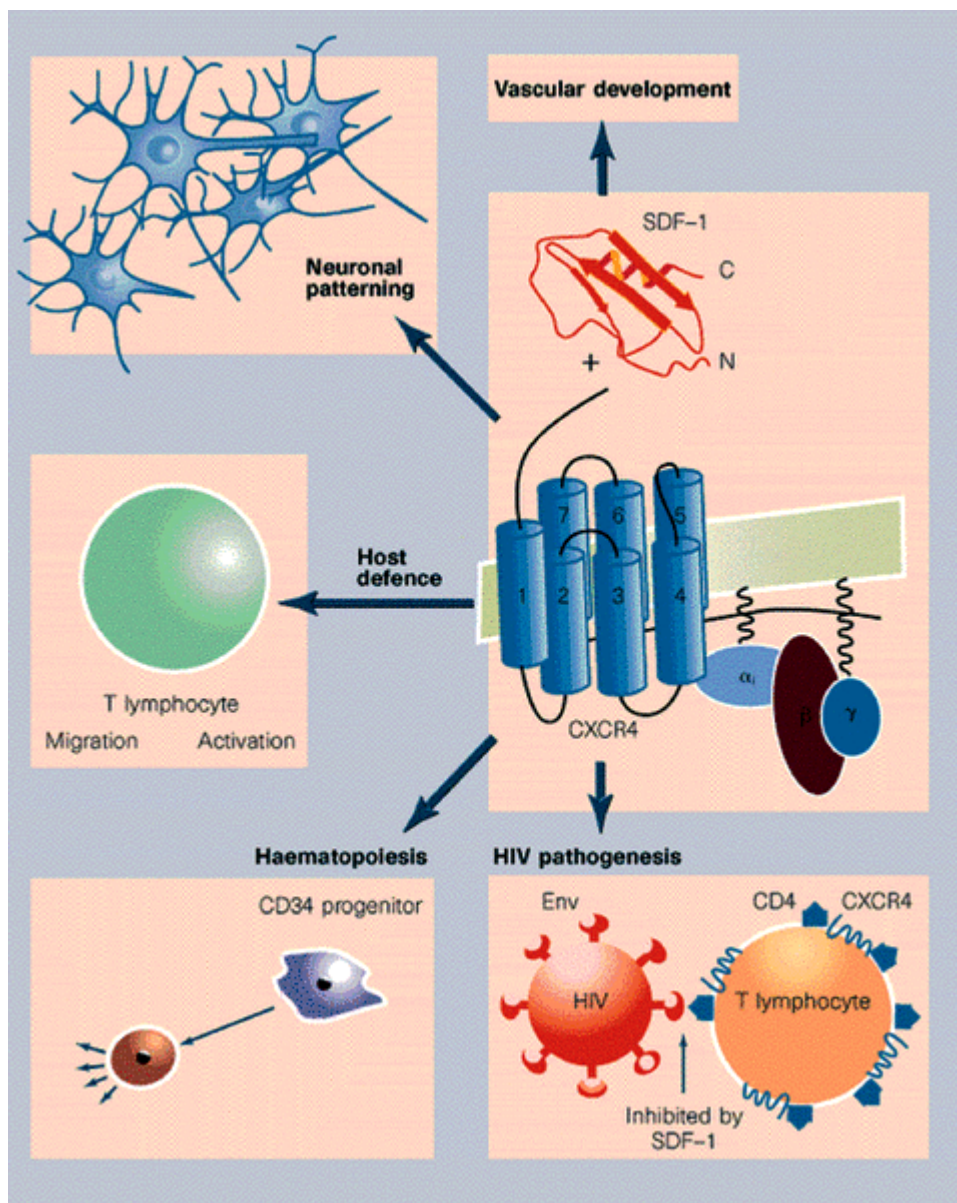


Figure 2.1 : Fonctions multiples de CXCR4. Tiré de Liang & al. [65].

2.1.2 DIMÉRISATION DE CXCR4

Il a été montré que plusieurs monomères du récepteur CXCR4 s'assemblent pour former des homodimères. Le récepteur présente également la capacité d'hétérodimériser avec d'autres récepteurs tels que le récepteur CCR2 [67]. Il est même fort probable que CXCR4 puisse former des homo et des hétéro-multimères. L'homodimérisation de CXCR4, démontré par test de BRET, dans lequel la mesure de transmission d'énergie lumineuse entre une paire de récepteur couplé respectivement à un émetteur d'énergie, la Rénilla luciférase (Rluc) et un accepteur d'énergie, la protéine fluorescente YFP a permis de conclure que celle-ci est de nature constitutive. Cela signifie que des dimères de CXCR4 existent à la surface cellulaire sans intervention au préalable du SDF-1.

On a pu observer que des mutants du récepteur β 2-adrénergique dont la dimérisation est affectée arrivent à la membrane plasmique avec une efficacité réduite de 50% par rapport au récepteur sauvage. L'inhibition de la dimérisation mène à la rétention des récepteurs dans le réticulum endoplasmique, ce qui indique un blocage dans leur biosynthèse et empêche donc le transport adéquat à la membrane plasmique [68]. L'homodimérisation aurait un rôle important dans la biosynthèse et le transport à la surface cellulaire des RCPGs et constituerait un mécanisme de contrôle de qualité lors de la synthèse des récepteurs.

2.1.3 MODULATION CONFORMATIONNELLE DE CXCR4

Percherancier & al. ont montré que les différents ligands de CXCR4 sont capables d'induire des changements conformationnels différents au sein de l'homodimère de CXCR4 [67]. Suite à la stimulation du récepteur avec ses différents ligands, les auteurs ont observé des changements conformationnels

reproductibles de l'homodimère de CXCR4 (résultant en une augmentation/ou diminution du signal de BRET) spécifiques à chacun des ligands.

B.I.4 RÔLE DE CXCR4

CXCR4 et son unique ligand SDF-1 jouent un rôle important dans l'embryogenèse. Les souris CXCR4^{-/-} ou SDF-1^{-/-} possèdent le même phénotype KO. Ces souris meurent durant la période périnatale car elles ont des défauts de formation des septae ventriculaires du cœur, de la vascularisation gastrique, du développement du cerveau, de la myélopoïèse dans la moelle osseuse, de la maturation des cellules B et de la lymphopoïèse [69-71]. Le rôle de CXCR4 chez l'adulte reste mal compris. Une étude réalisée par Peled & al. a toutefois suggéré que CXCR4 régule l'ancrage des cellules souches humaines transplantées dans les souris NOD/SCID [72]. Le rôle de CXCR4 a été démontré dans l'adressage des leucocytes dans la moelle osseuse, la transmigration endothéliale, et la néovascularisation en plus de la signalisation des cellules neuronales de l'hippocampe [73].

Hormis les nombreuses fonctions physiologiques, le couple CXCR4/SDF-1 participe également à plusieurs pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, l'asthme bronchial et l'athérosclérose. Cette dérégulation induit une inflammation chronique. Dans pareil cas, les chimiokines recrutent les leucocytes qui perpétuent l'inflammation en endommageant tout le tissu. Le couple CXCR4/SDF-1 est également impliqué dans la propagation des métastases dans les cancers du poumon ou du sein puisque les cellules d'une tumeur primaire migrent vers les sites métastatiques qui expriment fortement le SDF-1. Les organes métastatiques peuvent être le foie, la moelle osseuse ainsi que les poumons dans le cas du cancer du sein [73].

2.1.4 MÉCANISME DE LA LIAISON DU SDF-1 À CXCR4

Notre étude se concentre sur la découverte d'inhibiteurs antirétroviraux de CXCR4 ayant pour propriété de ne pas compétitionner avec la liaison du SDF-1 au récepteur, mécanisme de liaison qui a été détaillé dans la présente section.

La chimiokine SDF-1 possède deux variants issus d'un épissage alternatif : le SDF-1 α et le SDF-1 β qui diffèrent par une extension de 4 acides aminés dans la partie C-terminale du SDF-1 β [65, 74]. Ces deux variants sont les seuls ligands endogènes de CXCR4 et leur effet sur le récepteur n'est pas distinguable. Les 2 variants du SDF-1 induisent l'augmentation de la mobilisation calcique intracellulaire et le chimiotactisme subséquent [75].

La liaison du SDF-1 à CXCR4 se fait comme suit : on assiste à un passage de l'état initial du récepteur au repos appelé R à un état transitionnel Rt. Il y a deux sites de liaison au SDF-1 sur le récepteur, soit le site 1 et le site 2, respectivement dans l'ordre de liaison. La première étape de la liaison brise le pont formé par les résidus Arg188 et Glu277 conduisant à l'exposition du Site 2 présent dans les domaines transmembranaires de CXCR4. La partie positive du SDF-1 lie la partie négativement chargée du récepteur au site 1. Les résidus critiques pour la liaison au site 1 sont Glu14, Glu15 et Tyr21. Cette même partie positive N-terminale lie par la suite la partie négativement chargée, présente dans le segment transmembranaire du récepteur, le site 2. Les résidus critiques pour la liaison au site 2 sont Asp97, Asp187 et Glu288. Cette étape de liaison en deux temps induit un changement de conformation du récepteur passant de l'état transitionnel Rt à l'état bioactif R*. Le récepteur activé peut alors signaler [65, 76] (Figure 2.2).

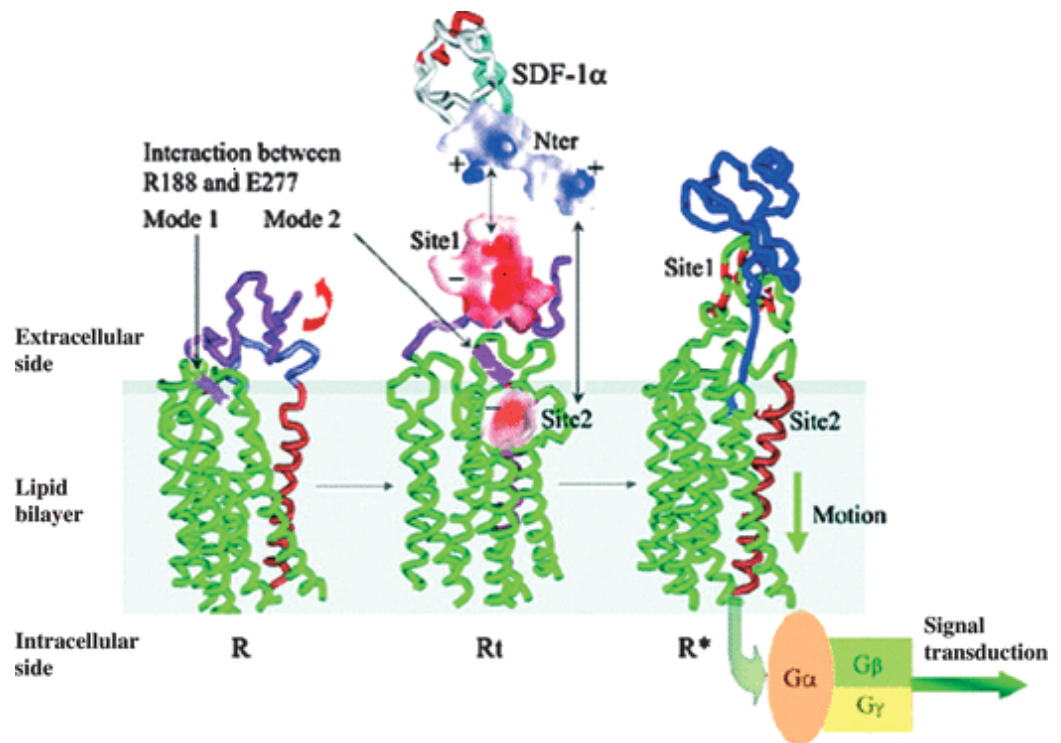


Figure 2.2 : Mécanisme de liaison du SDF-1 à CXCR4. Tiré de Liang & al. [65].

2.1.5 SIGNALISATION INDUITE PAR CXCR4

La signalisation induite par le SDF-1 sur CXCR4 engendre une multiplicité de signaux, variant d'un type cellulaire à l'autre. Comme la plupart des récepteurs de chimiokine, CXCR4 est couplé à une protéine G α i et peut être couplé à une protéine G α q [77]. CXCR4 active entre autres la voie de la PI3-Kinase (phosphatidylinositol 3 kinase), la voie de la mobilisation calcique ainsi que les kinases telles que Pyk2 (proline rich kinase 2) et les kinases apparentées à la famille Src. L'effet résultant de la signalisation de CXCR4 sur le cytosquelette est médié par les petites GTPases représentées par Rho, Rac et Cdc 42. L'activation de la JAK2 (Janus Kinase 2) permet la migration des cellules hématopoïétiques progénitrices, et l'activation de la LIM kinase 1 celle des cellules T [78-80].

En plus de son rôle fonctionnel, la signalisation induite par le SDF-1 peut avoir un rôle transcriptionnel sur plusieurs gènes via la voie des MAPKs, NF κ B et JAK/STAT. Cet effet régulateur de la transcription aurait un rôle dans la protection anti-apoptotique des cellules CD34+ et augmenterait l'expression des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) [75].

La désensibilisation du récepteur est médiée par sa phosphorylation au niveau C-terminale intra-cytoplasmique [81].

2.2 DE L'ATTACHEMENT DU VIRUS A L'IMPLICATION DE CXCR4 DANS LA PATHOGENÈSE

L'étape cruciale permettant l'entrée du virus dans les cellules hôtes consiste en l'interaction du virus avec un récepteur d'entrée et un corécepteur. Nous verrons dans cette section que d'autres partenaires sont impliqués dans les étapes qui précèdent l'entrée du virus afin d'en augmenter l'efficacité.

2.2.1 ATTACHEMENT DU VIRUS PAR DC-SIGN ET L'INTÉGRINE $\alpha 4\beta 7$

La protéine « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin » (DC-SIGN) est une protéine exprimée à la surface des cellules dendritiques à laquelle la glycoprotéine d'enveloppe virale se lie. DC-SIGN permet d'élever la concentration de virus à la surface cellulaire. L'infection qui implique DC-SIGN s'effectue selon deux modes : en *cis* (infection de la cellule la cellule dendritique elle-même) ou en *trans* (transmission du virus de la cellule dendritique à une cellule cible) [82, 83]. La liaison du virus aux cellules dendritiques permettrait à ces dernières d'infecter les organes lymphoïdes secondaires riches en cellules T. Les cellules dendritiques exprimant DC-SIGN assureraient ainsi la propagation du virus dans l'organisme. Il a été montré récemment que le virus pouvait également s'attacher à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée à la surface des lymphocytes T [84]. Cette étape serait le préalable à la transmission virale via des contacts cellules-cellules appelées «synapses virologiques».

2.2.2 ENTRÉE DU VIRUS

2.2.2.1 LE RECEPTEUR CD4

Après avoir été démontré *in vivo* que les cellules cibles du VIH étaient les lymphocytes CD4+, il a été montré que la molécule CD4 pouvait directement lier la glycoprotéine d'enveloppe virale [85-87]. La molécule CD4 joue un rôle crucial dans l'activation immunitaire des lymphocytes T en se liant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) associé à l'antigène présent à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène. Il a été démontré que l'expression de CD4 à la surface de cellules murines permettait la liaison de la gp120 sans favoriser l'infection de ces dernières [88]. D'autres facteurs exprimés à la surface cellulaire devaient permettre conjointement à CD4 d'assurer l'infection des cellules cibles : les corécepteurs.

2.2.2.2 IMPORTANCE DES CORECEPTEURS CXCR4 ET CCR5

La formation du complexe gp120-CD4 induit un changement conformationnel des boucles V1, V2 et V3 de la gp120, ainsi que du feuillet β , démasquant le site de liaison au corécepteur CXCR4 ou CCR5. La gp120 lie le corécepteur, induisant un changement conformationnel des complexes trimériques gp120/gp41. Le peptide gp41 s'insère dans la membrane cellulaire et provoque la fusion des membranes virales et cellulaires (Figure 2.3).

L'enveloppe virale semble utiliser une conformation particulière de CXCR4 mettant en jeu toutes les boucles extracellulaires. Il a été montré que la capacité de liaison de l'enveloppe gp120 monomérique au récepteur ne corrèle pas avec la capacité de fusion virale. Certains mutants et chimères du récepteur ont montré une activité coréceptrice sans liaison détectable de l'enveloppe virale et une capacité inverse de liaison de l'enveloppe virale sans activité coréceptrice.

Des faits similaires ont été observés avec le récepteur CCR5, pour lequel de très faibles modifications de la protéine ont montré une perte complète de la fonction coréceptrice [89]. Ce fait vient appuyer l'hypothèse que la simple liaison au corécepteur n'est pas suffisante pour permettre la fusion virale. Le changement conformationnel du corécepteur subséquent à la liaison du virus serait l'étape cruciale conduisant à l'entrée virale. Certains mutants du corécepteur présenteraient la capacité de lier l'enveloppe virale mais un blocage conformationnel induit par la/les mutation(s) du récepteur empêcherait le virus de pouvoir pénétrer dans la cellule hôte.

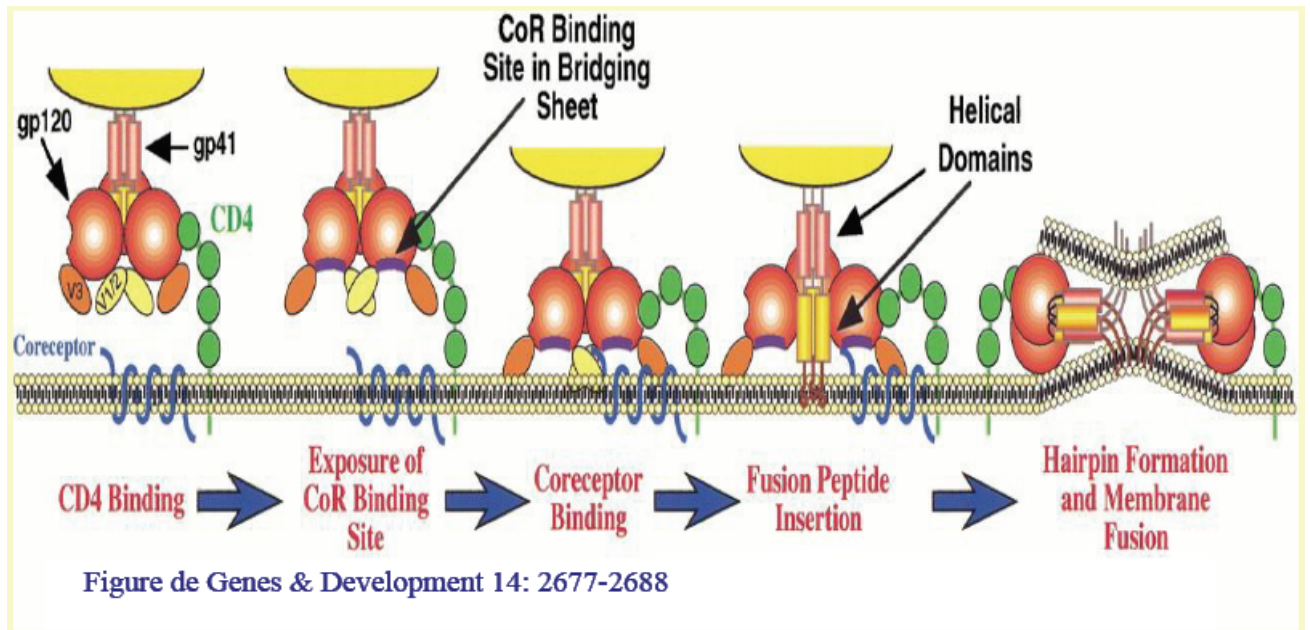


Figure 2.3 : Entrée du VIH dans les cellules cibles. Les étapes successives ont lieu comme suit : 1) Interaction CD4/gp120 2) changement conformationnel de la gp120 et libération du site d'interaction avec le corécepteur 3) liaison de la gp120 au corécepteur 4) ancrage de la gp41 dans la membrane cellulaire 5) adoption par la gp41 d'une structure en épingle à cheveux 6) rapprochement des enveloppes virales et cellulaires et fusion subséquente. Tiré de Doms & al. [90].

2.2.3 IMPLICATION DE CXCR4 DANS LA PATHOGÉNÈSE VIRALE

L'activité de signalisation de CXCR4 n'est pas requise pour l'étape d'entrée. En effet, le blocage de la protéine G α i par la toxine pertussique, la mutation du motif hautement conservé Asp-Arg-Tyr (DRY) indispensable à l'activité signalisatrice, la modification de la seconde boucle intracellulaire ou encore l'élimination de l'extrémité C-terminale du récepteur engendrent une incapacité du récepteur à signaler mais permettent l'entrée virale [91-93]. Bien qu'entrée virale et signalisation de CXCR4 soient indépendantes, nous verrons dans cette section que le virus a échafaudé des stratégies lui permettant d'utiliser l'activité du récepteur à son avantage pour sa pathogénèse.

2.2.3.1 ACTIVATION DES MAP KINASE PAR LE VIRUS

L'activation des voies de signalisations intracellulaires par CXCR4 a un impact direct sur les étapes de post-entrée et de réplication virale. La gp120 de virus X4 active par sa liaison au récepteur CD4 la voie des ERKs (Extracellular Signal-Regulated Kinase), indépendamment de la liaison à CXCR4 [94]. Les virus R5 tropiques ont besoin de la liaison à CCR5 pour activer la voie des ERKs, des JNKs (Jun N-terminal Kinase) et de p38 [95]. Un effet pro-pathogénique de l'activation de ces MAPKs est l'augmentation de la prolifération des cellules infectées. Les MAPKs activent également les facteurs AP1 (Activator Protein-1) et NF- κ B (Nuclear Factor κ B) ce qui a pour effet d'augmenter l'expression des gènes viraux et de faciliter ainsi la réplication virale [96-98].

L'activation des MAPKs induit également la production de cytokines capables de réguler la réplication virale [99].

2.2.3.2 INDUCTION DE LA MIGRATION ET DU RECRUTEMENT CELLULAIRE PAR LE VIRUS VIA LES CORÉCEPTEURS

La propagation du virus a lieu grâce au recrutement des cellules hôtes au site d'infection. La liaison de la gp120 à CXCR4 ou CCR5 active la tyrosine kinase PYK2 et la FAK (Focal Adhesion Kinase), induisant une signalisation similaire à celle des chimiokines naturelles. L'activation de ces kinases conduit à des remaniements du cytosquelette permettant la polarisation et la motilité cellulaire. Les lymphocytes T et les macrophages sont recrutés aux sites d'infection, favorisant la diffusion et la dissémination virale. Les remaniements cytosquelettiques assurent également la translocation nucléaire du virus [100, 101].

2.2.3.3 RÉGULATION DE L'APOPTOSE DE LA CELLULE HÔTE PAR LE VIRUS VIA LES CORÉCEPTEURS

Une balance semble exister entre signaux pro-apoptotique induits par la gp120 et signaux anti-apoptotiques induits par les chimiokines naturelles. La liaison de la gp120 à CXCR4 induit une réponse apoptotique médiée par les caspases [102, 103]. La liaison de la gp120 à CCR5 chez les macrophages a montré une activation de la PYK2 et l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium conduisant à l'apoptose [101]. La réponse pro-apoptotique est médiée par l'activation des protéines $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_{14/15}$ capables de stimuler les kinases de stress telles que JNK et p38 [104]. Au contraire, l'activation de la protéine $G\alpha_i$ par le SDF-1 semble induire une réponse anti-apoptotique dans les lymphocytes T via la PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) et l'AKT/PKB (Protein Kinase B) [105]. Une hypothèse serait que la modification de l'équilibre entre signaux pro-apoptotiques induit par la gp120 et anti-apoptotique induit par le SDF-1 pourrait expliquer l'évolution de la maladie, celle-ci s'achevant par une déplétion majeure des cellules immunitaires.

L'utilisation de CXCR4 par le virus en tant que vecteur d'entrée dans la cellule hôte et récepteur clef favorisant sa pathogenèse renforce l'idée d'une thérapie anti-rétrovirale ciblant ce corécepteur. Plusieurs inhibiteurs de CXCR4 de nature différente existent aujourd'hui au stade expérimental et constituent une forte avenue de recherche.

2.3 INHIBITEURS DE CXCR4 EN DÉVELOPPEMENT

2.3.1 PEPTIDES DÉRIVÉS DES SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES DE CXCR4

La dimérisation des récepteurs de chimiokines et plus généralement des RCPGs serait un prérequis pour la fonction des RCPGs. Elle pourrait ainsi constituer une cible pharmacologique importante.

Dans le cas de notre récepteur d'intérêt, il a été montré dans l'étude de Tarasova & al. que des peptides correspondant au TM2, 4, 6 et 7 de CXCR4, peuvent bloquer les fonctions du récepteur [106]. L'hypothèse est que l'ajout d'un peptide correspondant à un domaine transmembranaire aurait un effet sur la fonction du récepteur en interférant dans l'association des domaines transmembranaires de ce dernier. La concentration des peptides TM4 et TM6 permettant l'inhibition totale de l'activité de CXCR4 est respectivement de $5 \pm 1 \mu\text{M}$ et $10 \pm 1 \mu\text{M}$. Une concentration en SDF-1 comprise dans un intervalle de 50 nM à 300 nM (K_d SDF-1 : 6 nM) ne présente pas d'effet sur l'activité antagoniste du peptide TM2. Les peptides TM6 et TM7 ont montré un effet synergique d'antagonisme sur la signalisation de CXCR4 induite par le SDF-1. Cette synergie pourrait être causée par une augmentation de l'affinité des deux peptides pour le récepteur [106]. L'effet antiviral des peptides TM a été testé en infectant des cellules CEM-SS par la souche RF du VIH-1. Les peptides TM2, 4

et 7 ont montré un effet antagoniste sur la fonction coréceptrice de CXCR4. Les auteurs proposent que l'effet des peptides résulte d'une compétition contre l'interaction naturelle des domaines TM du récepteur. Les récepteurs deviennent inactifs puisque les domaines TM du récepteur n'interagissent plus entre eux mais avec les peptides TM exogènes. L'effet antagoniste des peptides pourrait dépendre de l'interaction avec le récepteur mais aussi de leur capacité à s'intégrer dans la membrane plasmique.

2.3.2 PEPTIDES DÉRIVÉS DE LA CHIMIOKINE SDF-1

Des dérivés du SDF-1 représentent un grand intérêt dans la recherche d'inhibiteurs d'entrée. Ces peptides tronqués du SDF-1 permettraient d'inhiber l'entrée du virus sans induire l'internalisation du récepteur. Basé sur le fait que les résidus de la région N-terminale du SDF-1 sont impliqués dans la liaison de la chimiokine au récepteur, les peptides mimant cette unique région seraient les plus actifs.

Le peptide dimérique 1-9 (P2G) (correspondant aux 9 premiers résidus du SDF-1 comportant une mutation dans le second résidu lié par un pont S-S au résidu 9) est un antagoniste de CXCR4 dérivé du SDF-1. Bien que l'affinité du peptide soit inférieure à celle du SDF-1 α natif, le dimère 1-9 (P2G) montre une absence de stimulation du récepteur [65]. Un autre peptide, 5-14 (C9W, F13-14f), comprenant les résidus 5 à 14 du SDF-1 avec deux mutations liées par un pont S-S au niveau de la cystéine 11, montrent une forte affinité pour le récepteur (IC_{50} : 290 nM) et une forte activité antivirale (IC_{50} : 130 nM). Ce peptide est 20 fois plus actif que son monomère correspondant. [107].

Des peptides issus de la partie N-terminale du SDF-1 conservent la capacité de lier CXCR4 ainsi que leur propriété antivirale. Les peptides antiviraux comprenant la séquence N-terminale entière du SDF-1 présentent une activité signalisatrice suivie d'une désensibilisation du récepteur. La délétion des

résidus K1 et P2 n'induit pas de signalisation mais désensibilise le récepteur. Le motif ELR, précédant le motif Cys-X-Cys est connu pour être important dans la liaison des ligands respectifs des récepteurs de l'interleukine 8, CXCR1 et CXCR2. La région correspondante chez la chimiokine SDF-1 est représentée par le motif LSY, essentiel à l'activité antivirale. La mutation L5H ne montre pas d'effet de signalisation sur la réponse calcique ni de désensibilisation du récepteur. Ce dérivé du SDF-1, le L5H, montre une activité antivirale (IC_{50} : 4 μ M) supérieure à celle des peptides non-mutés [108].

Les données de cette étude suggèrent que les peptides dérivés du SDF-1 se lient au site II du récepteur puisqu'ils sont capables d'induire une activité signalisatrice. Le peptide L5H est celui présentant l'activité signalisatrice la plus faible comparativement aux autres dérivés et son mécanisme antiviral n'est pas corrélé à une activité de désensibilisation du récepteur. L'hypothèse est que ce peptide induit un changement conformationnel du récepteur qui le rend incompatible à lier la gp120.

Les résultats de ces études démontrent que la propriété antivirale des peptides dérivés du SDF-1 est structurellement indépendante de celle permettant d'induire l'activation ou le blocage de la signalisation du récepteur. Ce fait est particulièrement important pour le développement de futurs inhibiteurs d'entrées.

2.3.3 INHIBITEURS NON PEPTIDIQUES DE FAIBLES POIDS MOLÉCULAIRE

2.3.3.1 DÉRIVÉS DU T22

Le polyphemusin II a été isolé du American horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) et ses dérivés tels que le T22 ((Tyr(5,12), Lys7)-polyphemusin II) sont des inhibiteurs de fusion spécifiques de CXCR4. Le T22 interagit avec la

portion N-terminale et les boucles extracellulaires ECL1 et ECL2 du récepteur [109]. L'activité antivirale du T22 a été testée sur plusieurs souches de HIV-1 et HIV-2 sur différentes lignées cellulaires et montre un EC_{50} de 80 nM [110, 111].

Une série d'analogues du T22 a été synthétisée (Figure 2.4). Parmi eux, le T140 montre la meilleure activité (Figure 2.5). Il contient 14 résidus dont la séquence est la suivante: Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-D-Lys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg. Les résidus Nal (2-naphthylalanine) en position 3 et Cit (citrulline) en position 12, Arg14, et le segment Arg1-Arg2-Nal3 en N-terminal sont essentiels pour l'activité antivirale [2, 112, 113].

L'activité antivirale du T140 est évaluée par le bromure de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (ou test MTT) en mesurant l'effet inhibiteur de la molécule sur la cytopathogénecite induite sur une lignée de lymphocytes T humains MT4 par le virus X4-tropique (HIV-1IIIB). Le T140 montre un EC_{50} de 3.5 nM dans cet essai [113, 114].

Le T140 est un inhibiteur puissant de la signalisation induite par le SDF-1 : il s'agit d'un antagoniste de CXCR4. Un essai de compétition de liaison entre le T140 et la chimiokine SDF-1 radiomarquée à l'iode-125 montre un EC_{50} de 0.023 nM [113].

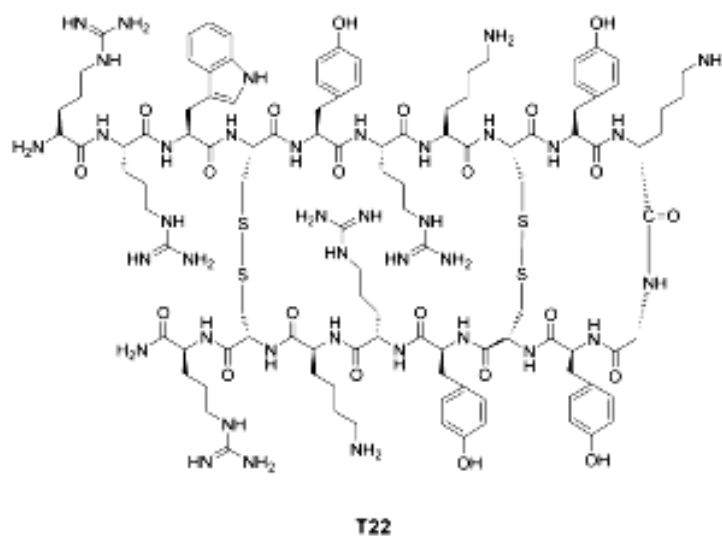


Figure 2.4 : Structure moléculaire du T22. Tiré de Liang & al. [65].

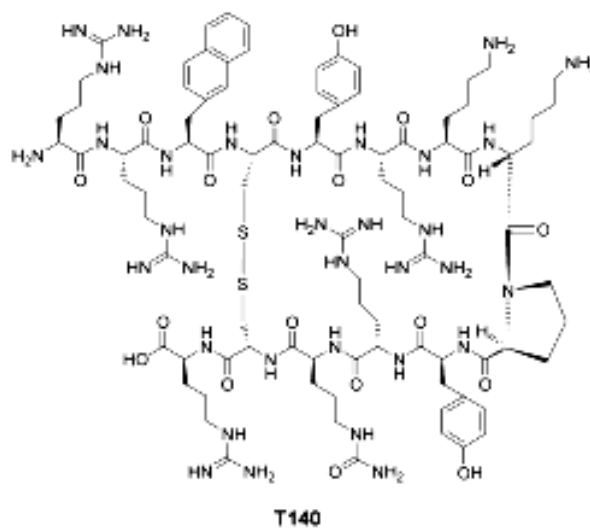


Figure 2.5 : Structure moléculaire du T140. Tiré de Liang & al. [65].

2.3.3.2 AMD 3100

La petite molécule AMD 3100 est un puissant et hautement sélectif inhibiteur de CXCR4. Il s'agit d'un bicyclame. Il bloque l'entrée du VIH-1 et du VIH-2 dans plusieurs types cellulaires avec un EC_{50} allant de <1.3 nM à 12.6 nM [65]. Cette molécule a été abandonnée en tant qu'agent antirétroviral vu son fort pouvoir de compétition avec le SDF-1. L'AMD 3100 connaît actuellement un second essor puisque elle a été retenue pour son activité mobilisatrice de cellules souches de la moelle osseuse [115] (Figure 2.6). L'accès facilité aux cellules souches permettrait d'augmenter considérablement l'efficacité des transplantations auto- et allogéniques dans le cadre de thérapie anti-leucémiques par exemple [116, 117]. L'AMD3100 est actuellement en phase III d'essai clinique.

Une autre molécule, l'AMD 3465, dont l' EC_{50} est de 6.1 nM est un monocyclame avec un groupement pyridinylmethylene et est comparable à l'AMD3100 [118]. Il a été montré que l'AMD 3465 est actif sur des souches de HIV-1 IIIB résistantes à la zidovudine. La molécule se lie aux mêmes résidus sur CXCR4 que l'AMD 3100 ainsi qu'à His 281.

La molécule KRH-16936 dont l' EC_{50} est de 19.3 nM est également un inhibiteur de CXCR4 dérivé du cyclo-pentapeptide FC131 (un dérivé du T140) [119, 120].

Toutes ces molécules ne sont cependant pas utilisables en thérapie puisqu'elles bloquent toutes puissamment la liaison du SDF-1 à CXCR4.

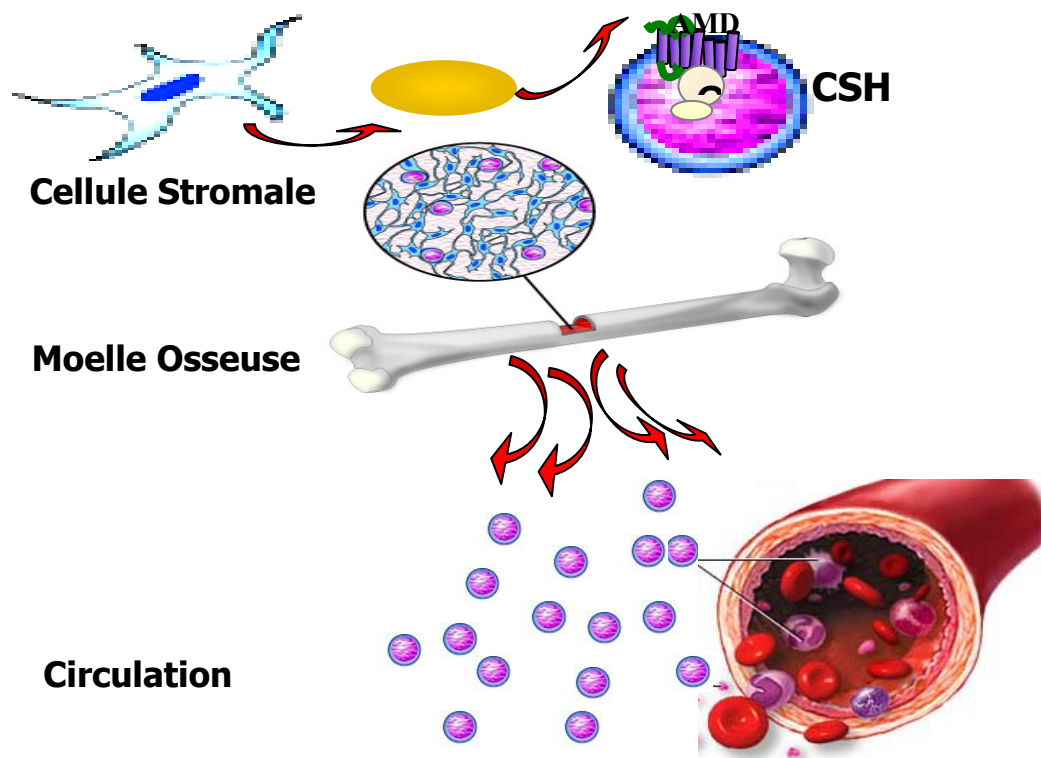


Figure 2.6: Activité mobilisatrice des cellules souches de la moelle osseuse par le bicyclame AMD3100.

2.3.3.3 DÉRIVÉS DU T140

Plusieurs inhibiteurs de faible poids moléculaires issus du T140 ont montré des fortes activités antivirales. Des analogues du T140 tels que le 4F-benzoyl-TN140003 et le 4F-benzoyl-TN14011 présentent une plus grande stabilité dans le sérum et ont été développés par insertion d'un groupement p-fluorobenzoyl agissant comme nouveau pharmacophore (Figure 2.7). Les analogues 4F-benzoyl-TN140003 et le 4F-benzoyl-TN14011 montrent une forte activité antivirale *in vitro* et une activité anticancéreuse chez un modèle de souris présentant des mélanomes ou des cancers du sein. Ces molécules présentent également une activité de réduction de l'arthrite rhumatoïde sur ce modèle animal. Les analogues du T140 présentent tous une activité anti-migration/activation/invasion des cellules cancéreuses pulmonaires, lymphoblastiques et pancréatiques [65, 121].

La réduction de la taille du T140 a également révélé une molécule présentant un motif pentapeptidique cyclique : le FC131 (Figure 3.5). La propriété du nouveau pharmacophore chez les analogues 4F-benzoyl-TN14003 and 4F-benzoyl-TE14011 est due à la présence d'un cycle aromatique dans la portion N-terminale soit respectivement les groupements p-fluorobenzoyl et p-trifluorométhylbenzoyl [121].

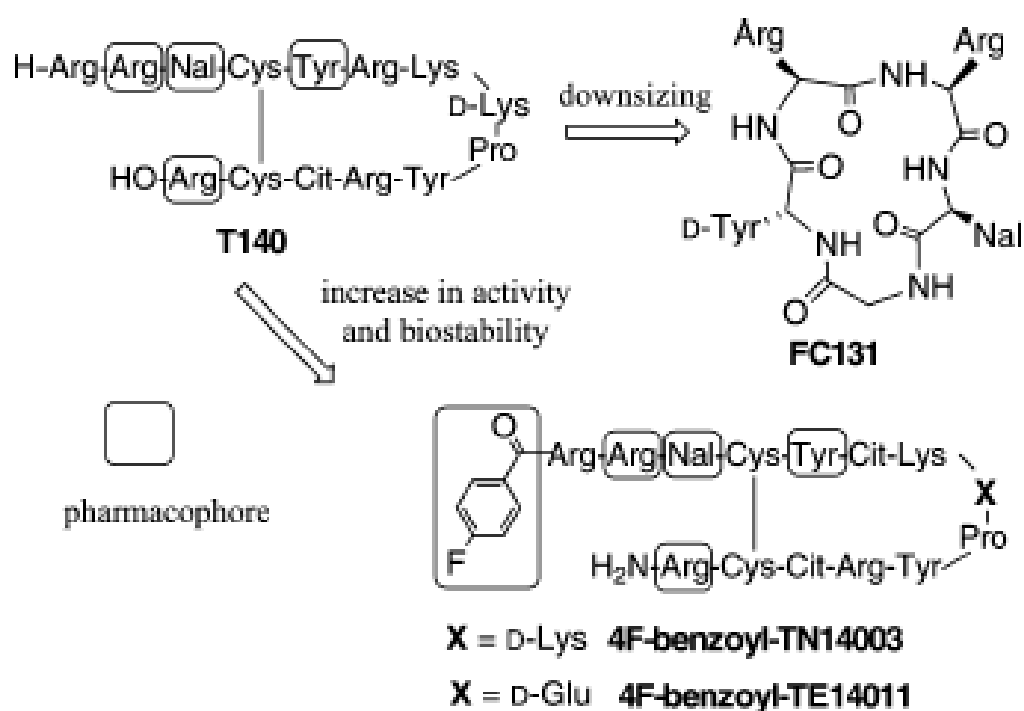


Figure 2.7 : Développement de dérivés du T140. Représentation des dérivés 4F-benzoyl-TN14003, 4F-benzoyl-TE14011 et FC131. Nal= L-3-(2 naphthyl)alanine, Cit = L-citrulline. Tiré de Tamamura & al. [121].

2.4 VERS DES INHIBITEURS D'ENTRÉE DE NATURE ALLOSTÉRIQUE

De la liste exposée ci-haut des inhibiteurs de CXCR4, le critère le plus important requis pour inhiber l'entrée du virus par ce récepteur, celui de ne pas interférer avec les fonctions naturelles du récepteur, n'est pas rempli ou non investigué. De ce fait, une molécule capable de lier un site sur le récepteur différent du site de liaison du ligand naturel, ou site orthostérique, est requise. Cette molécule aurait pour propriété d'agir par un mécanisme dit allostérique (du grec *allos* : autre et *stereon* : relief). Il n'existe pas d'évidences à l'heure actuelle prouvant l'existence d'inhibiteurs allostériques de CXCR4 alors qu'elles existent pour le récepteur CCR5. Nous examinerons ici les inhibiteurs allostériques existants de CCR5 pour mieux développer ensuite les faits qui nous ont conduit dans cette étude à exploiter une piste relative à la découverte d'inhibiteurs de CXCR4 allostériques.

2.4.1 INHIBITEURS DE CCR5 ALLOSTÉRIQUES

Plusieurs inhibiteurs antagonistes de CCR5 ont vu le jour depuis qu'une étude a démontré que l'utilisation de bloqueurs du récepteur est sans danger pour la santé humaine. D'autres études ont démontré que des ligands identifiés de CCR5 se liaient au récepteur sur un site allostérique. Des études de compétitions entre des antagonistes du récepteur et les ligands naturels radiomarqués à l'iode-125 ont permis de montrer que des molécules telles que le SCH-C, SCH-C, 351125, UK-427,857; TAK779 et 873140 (Figure 2.8) ne compétitionnaient pas avec les ligands naturels du récepteur [55].

Le point de départ de l'étude réside en l'idée que l'activité antivirale démontrée de ces petites molécules ne peut pas être due à une compétition directe entre ces dernières et le virus vu la grande taille de la protéine virale impliquée dans la

fusion. D'autre part, le fait que plusieurs régions à la fois sur CCR5 et sur la gp120 soient nécessaires pour ce processus et que les antagonistes soient de faible poids moléculaire corrobore l'hypothèse d'un mécanisme allostérique dans lequel la conformation du récepteur induite par les molécules est responsable de l'effet antiviral.

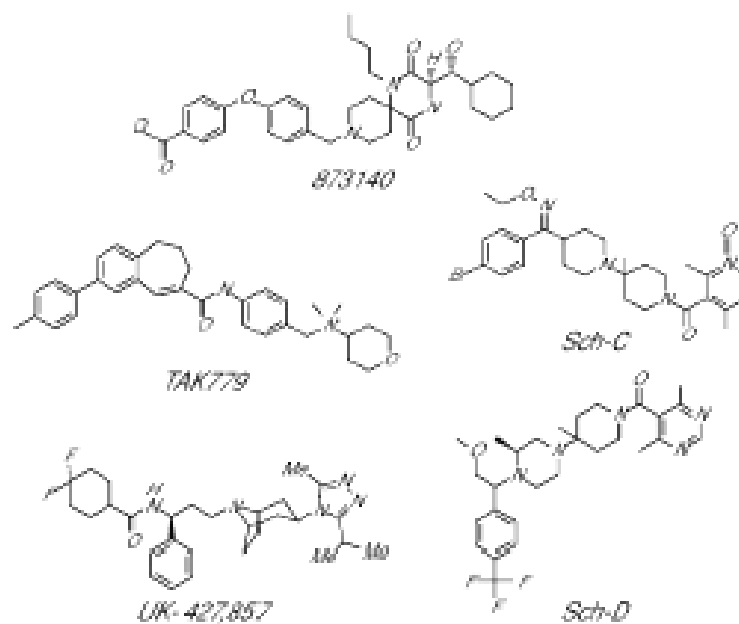


Figure 2.8 : Structure moléculaire des inhibiteurs allostériques de CCR5.
Tiré de Watson & al. [55].

Dans le cas de l'inhibiteur 873140, aussi connu sous le nom d'aplaviroc, il agit en produisant une modulation allostérique sur le récepteur CCR5. L'aplaviroc empêche la liaison de la chimiochine radiomarquée ^{125}I -MIP1 α sans interférer avec la liaison de la chimiochine radiomarquée ^{125}I -RANTES, à la différence du TAK779 qui empêche la liaison des deux chimiokines [55].

Ces inhibiteurs agissent en stabilisant des conformations différentes du récepteur. Ce fait est d'un intérêt très particulier pour déterminer comment contrecarrer la résistance prévisible du virus aux inhibiteurs. La mutation spontanée de l'enveloppe virale sous la pression imposée par l'inhibiteur peut induire l'émergence de souches résistantes pouvant utiliser le récepteur modulé allostériquement. Des mutations spontanées du HIV-1 sont connues pour causer des changements dans la séquence de l'enveloppe sans perte de la fonction. Un mutant de résistance a été montré dans des études portant sur l'inhibiteur AD101, un antagoniste structurellement similaire au SHC-C. L'hypothèse suivie est que si des mutants de résistance apparaissent pour contrer une conformation de CCR5 stabilisée par un inhibiteur, il est peu probable que ce mutant puisse s'adapter à une nouvelle conformation stabilisée par l'ajout d'un deuxième inhibiteur [55].

Cette étude constitue la preuve conceptuelle que des inhibiteurs de RCPGs peuvent se lier sur des sites allostériques, différents des sites de liaisons des chimiokines. Elle appuie notre recherche d'inhibiteurs de CXCR4 susceptibles d'agir également par mécanisme allostérique.

2.4.2 VERS DES INHIBITEURS DE CXCR4 ALLOSTÉRIQUES

2.4.2.1 EXEMPLE D'UN DÉRIVÉ DU SDF-1

Un peptide correspondant à la portion N-terminale de CXCL12 dans lequel les quatre premiers acides aminés KPVS sont remplacés par ASLW se comporte comme un agoniste allostérique de CXCR4 et montre une propension supérieure au ligand naturel à induire la migration cellulaire. Cet effet est en partie du au fait qu'à la différence de CXCL12, le peptide ASLW n'induit pas l'internalisation du récepteur. L'action du peptide ASLW sur la réponse migratoire n'est pas affectée par l'antagoniste orthostérique et inhibiteur d'entrée du VIH, AMD 3100 [122].

Cette propriété du peptide est prometteuse d'un point de vue thérapeutique. La coadministration d'un antagoniste orthostérique avec un agoniste allostérique pourrait permettre le blocage de la fusion virale en maintenant la fonction signalisatrice migratoire induite par CXCR4 [122].

2.4.2.2 UNE PISTE SUIVIE: LES DÉRIVÉS DU T140

Les dérivés issus du puissant inhibiteur de faible poids moléculaire T140 ont particulièrement attirés notre attention à l'examen de l'étude de Tamamura & al. [121]. Certains composés tels que ceux encadrés ci-dessous semblaient présenter une activité antivirale (EC_{50}) à des concentrations où ils n'interféraient pas avec la liaison du SDF-1 à CXCR4 (Tableau 1). Pour exemple, le composé 7 présente un EC_{50} antiviral de 1.7 μ M et un IC_{50} compétitif de la liaison du SDF-1 à CXCR4 supérieur à la limite de détection ($>1 \mu$ M). On présume alors que le composé 7 inhibe l'entrée virale à une concentration qui n'inhibe pas la liaison du SDF-1 à CXCR4, soit que $EC_{50} < IC_{50}$.

Table 1 Cytotoxicity, anti-HIV activity and inhibitory activity against CXCL12 binding to CXCR4 of the synthetic compounds

Compound	CC ₅₀ /μM ^a	EC ₅₀ /μM ^b	IC ₅₀ /μM ^c
1	>100	>100	0.32–1
2	>100	52	0.32–1
3	>100	46	0.32–1
4	>100	22	0.090
5	>100	26	0.30
6	>100	11	0.32–1
7	>100	1.7	>1
8	>100	45	0.30
11	>100	7.7	>1
14	>100	6.0	>1
30	>100	61	>1
39	66	7.4	>1
FC131	>100	0.073	0.0032
T140	>10	0.026	0.0045
AZT	>100	0.014	

Tableau 1: Activités antivirales et compétitives de la liaison du SDF-1 à CXCR4 des dérivés du T140. EC50 : concentration du dérivé correspondant à 50% d'inhibition de l'infection. (Test de cytopathogénicité induit par le virus X4-tropique (HIV-1IIIB) en cellules MT4). IC50 : concentration du dérivé correspondant à 50% d'inhibition de la liaison de la chimiokine SDF-1 radiomarquée a l'iode-125. Tiré de Tamamura & al. [121].

3 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'objet de mon travail consiste en une stratégie antirétrovirale ciblant CXCR4 puisque les phases avancées de l'infection voient émerger des souches virales utilisant ce corécepteur pour pénétrer les cellules cibles. En second lieu, CXCR4 étant également impliqué dans de nombreuses autres pathologies telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde et la diffusion métastatique, une hypothèse est que les inhibiteurs initialement mis au point dans le but d'une thérapie antirétrovirale puissent également remplir d'autres fonctions thérapeutiques.

CXCR4 en plus d'être la porte d'entrée du VIH, possède des fonctions essentielles à la physiologie de l'organisme, notamment un rôle crucial dans la migration des cellules immunitaires. Notre défi consiste à découvrir des inhibiteurs capables d'agir exclusivement sur la fonction coréceptrice sans interférer avec la migration cellulaire et ce sur une longue période de traitement. L'inhibiteur d'entrée rétrovirale AMD3100 bloque la liaison du SDF-1 au récepteur et induit une mobilisation massive des cellules souches de la moelle osseuse dans la circulation, ce qui constitue un effet indésirable inhérent à son mécanisme d'action. Ce type d'inhibiteur ne remplit pas les conditions pour une thérapie antirétrovirale à long terme.

À la différence de CXCR4, le récepteur CCR5 ne constitue pas un tel défi. Il est en effet connu que la mutation $\Delta 32$ provoque un récepteur inactif présent chez plusieurs individus caucasiens adultes sains [47-49]. Des inhibiteurs d'entrée rétrovirale ciblant CCR5 sont actuellement sur le marché (Maraviroc). Comme évoqué précédemment, les inhibiteurs antirétroviraux ciblant CXCR4 doivent remplir une condition : conserver les fonctions naturelles du récepteur ou en d'autre terme, ne pas interférer avec la liaison du SDF-1 au récepteur et sa signalisation subséquente. Un tel type d'inhibiteurs aurait donc pour propriété non pas de se lier sur le site de liaison du SDF-1, le site orthostérique, mais sur des sites différents : *des sites allostériques*. Les inhibiteurs de CCR5 possèdent effectivement tous cette propriété d'allostérie. La propriété allostérique ne constitue cependant pas un critère suffisant. En effet, ce type d'inhibiteur, bien

que se liant sur des sites différents du récepteur que ceux des chimiokines naturelles, peuvent malgré tout inhiber la signalisation de ces dernières. Ces inhibiteurs allostériques peuvent modifier la conformation du récepteur et la rendre incompatible avec une activité signalisatrice. L'existence d'inhibiteurs allostériques de CCR5 constitue une preuve conceptuelle nous permettant de croire que de tels inhibiteurs de CXCR4 puissent voir le jour. Le but final est la découverte d'inhibiteurs allostériques de CXCR4, qui à la différence des inhibiteurs allostériques de CCR5, n'induisent pas des conformations du récepteur incompatibles avec une activité signalisatrice.

Pour répondre à nos objectifs, trois pistes ont été suivies. La première portait sur l'étude d'inhibiteurs peptidiques mimant des portions transmembranaires ou extracellulaires de CXCR4, la seconde sur l'étude de dérivés de la chimiokine SDF-1 et, enfin, la troisième sur l'étude de dérivés du T140. Les buts spécifiques suivis furent les suivants (Annexe 9):

- 1) Évaluer l'effet des différents types d'inhibiteurs sur la capacité d'induire une protection contre l'infection par le VIH.
- 2) Évaluer leur interférence sur une fonction naturelle du récepteur : la migration cellulaire.
- 3) Évaluer leurs effets sur la modulation conformationnelle du récepteur.

L'étude relative aux peptides transmembranaires, extracellulaires de CXCR4 ainsi que les dérivés du SDF-1 nous a permis d'établir une collaboration avec le laboratoire du Dr. William Lubell. L'étude relative aux inhibiteurs dérivés du T140 nous a permis d'établir une collaboration avec une équipe japonaise dirigée par le Dr Nobutaka Fujii et spécialisée dans la synthèse de ces dérivés. Certains composés dérivés du T140 présentés dans l'étude "*Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140*

analogs" parue en mars 2006 dans la revue Organic & Biomolecular Chemistry [121] semblaient ne pas compétitionner avec la liaison du SDF-1 à CXCR4. Ce fait a particulièrement attiré notre attention puisqu'il semblait remplir le critère que nous recherchions en terme de propriété allostérique.

Par ailleurs, un des objectifs que je m'étais fixé au cours de cette maîtrise était la mise au point d'une technique permettant d'évaluer la migration cellulaire grâce à une lecture de fluorescence automatisée puisque la technique courante utilisée dans le laboratoire était basée sur un comptage visuel, méthode présentant des limites de précision et d'objectivité.

4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTIONS ET PLASMIDES

Les cellules adhérentes HEK293T, Hela P4, U373MG, U373MG X4.15, U373MG R5.3 ont été maintenues en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF Cansera International Inc), 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine et 2 mM de L-glutamine (GIBCO). Les cellules REH ont été maintenues en culture dans du milieu RPMI (Invitrogen) enrichi avec 10% de SVF, 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine et 2 mM de L-glutamine. Les cellules Hela P4 expriment de façon stable CD4, CXCR4 et le gène rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur LTR du VIH-1. Les lignées cellulaires U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont été en premier lieu transfectées de façon stable avec un plasmide codant pour CD4 et une cassette d'expression contenant le gène rapporteur LacZ sous le promoteur LTR du VIH-1 [123]. Elles ont ensuite été transfectées de façon stable avec CXCR4 sauvage (U373MG X4.15) ou avec CCR5 sauvage (U373MG R5.3). La β -galactosidase possède une séquence de localisation nucléaire permettant de différencier les cellules infectées de celles qui sont non infectées. Les cellules HEK293T, U373MG et Hela P4 ont été transfectées à l'aide de la polyéthylèneimine (PEI).

4.2 CONSTRUCTION DES MUTANTS DE CXCR4

Les mutants de CXCR4 ont été obtenus par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel [124]. Le vecteur pRC-CMV-CXCR4 a été transformé dans une souche bactérienne *dut⁻ung⁻*. Cette souche est déficiente en l'enzyme qui normalement enlève l'uracile incorporé dans l'ADN. On obtient alors un vecteur pRC-CMV-CXCR4 où les thymidines sont remplacées par des uraciles. L'infection de la culture bactérienne par le phage M13K07 (New England Biolabs) a permis d'obtenir de l'ADN simple brin après précipitation des phages

et extraction de l'ADN au phénol/chloroforme. La matrice simple brin de pRC-CMV-CXCR4 où les thymidines sont remplacées par des uraciles a été utilisée pour la mutagenèse. Après hybridation avec un oligonucléotide de mutagenèse, l'étape de polymérisation a donné naissance à un ADN hybride contenant un brin muté et un brin sauvage contenant l'uracile. L'ADN hybride a été transformé dans une souche *ung+*, où les uracyle N-glycosylases retirent les uraciles, produisant des sites apuriniques. Ces sites bloquent la synthèse d'ADN et seul le brin muté se réplique. Les sites apuriniques sont ensuite coupés et l'ADN polymérase I fait la réparation. Comme cette polymérase à une activité 5'-3' exonucléase, on obtient un déplacement de coupure au cours duquel la mutation est introduite dans le brin matrice.

Les mutants obtenus sont des mutants de substitutions où des résidus alanines remplacent les résidus aux positions de la Tyrosine 190 et de la Glycine 207. Les séquences des oligonucléotides de mutagenèse sont les suivantes:

Oligonucléotide de substitution Y190A

5' GGATGACAATACCAGGCAGGATAAGCTGCTGAAACTG 3'

Oligonucléotide de substitution G207A

5' CCACAAGTCATTGGGGGCGAACCGGTTGTCATCTGCC 3'

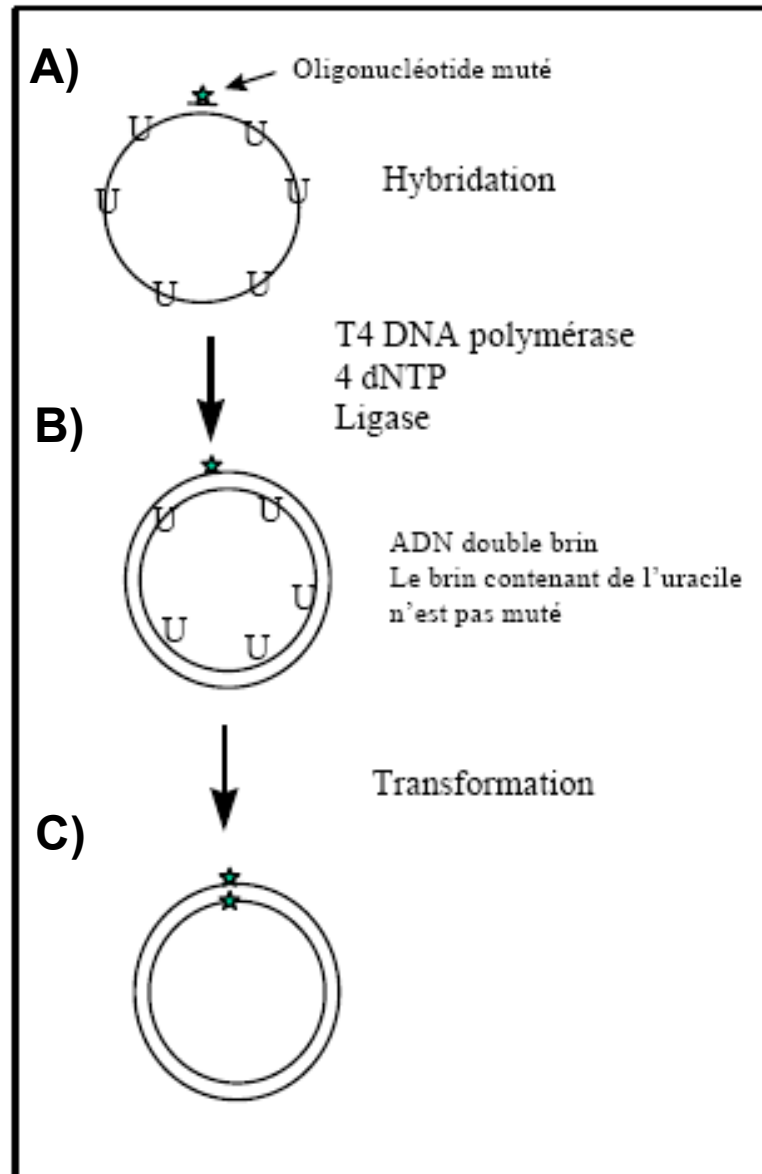


Figure 4.1 : Mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel

A) Hybridation du simple brin p-RC-CMV-CXCR4 uracylé avec l'oligonucléotide de mutagenèse B) Polymérisation et obtention d'un ADN hybride : Brin sauvage/ Brin muté C) Transformation dans des bactéries *dut⁺ung⁺* et obtention d'un ADN double brin pRC-CMV-CXCR4 muté.

4.3 CYTOMÉTRIE DE FLUX

Les cellules HEK293T transfectées avec CXCR4-YFP/CXCR4-Luc et les cellules 373 transfectées avec les formes sauvages et mutées de CXCR4 ont été récupérées à l'aide d'une solution de PBS (phosphate-buffered saline) 24 heures après la transfection. Elles ont été ensuite incubées avec un anticorps monoclonal anti-CXCR4 (12G5PE eBioscience), 45 minutes à 4°C dans une solution de PBS+2% SVF. Les cellules ont été lavés au PBS froid (4 °C) puis resuspendues dans du PBS + formaldéhyde 1%. Finalement, l'intensité de la fluorescence à la surface des cellules a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide de l'appareil FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience).

4.4 PRÉPARATION DU PLASMIDE D'EXPRESSION PORTANT LE PROVIRUS DU VIH-1_{89.6}

La préparation des plasmides d'expression portant les provirus du VIH-1 a eut lieu comme suit : pour éviter la délétion de segments du provirus viral, les préparations bactériennes ont été cultivées dans 50 mL de Luria Broth, à 30°C, durant 24 à 36 h, avec une agitation de 120 rpm. Le vecteur p89.6 (NIH AIDS Research and Reference Program) a été isolé et purifié par midi prep (Wisent) et a été analysé par restriction enzymatique (EcoRII) afin de s'assurer de son intégrité.

4.4.1 PRODUCTION DES PARTICULES VIRALES DU VIH-1_{89.6}

Les cellules Hela P4 (5.5×10^6) ont été cultivées dans des flacons de culture 75 cm² et ont été transfectées avec 25 µg de provirus VIH-1_{89.6}. Les surnageants contenant les virus ont été récoltés 48h post-transfection et ont été filtrés (aliquots de 1 mL, congelés à -80°C avant utilisation). Des cellules U373MG X4.15, U373MG R5.3 et Hela P4 ont été infectées avec des dilutions

croissantes de virus afin de doser l'infectivité de celui-ci. Les dilutions optimales de virus pour l'infection des cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 sont 1:35 et 1:10 respectivement. Ces concentrations fournissent une sensibilité suffisante pour les tests antiviraux.

4.4.2 TEST D'INHIBITION DE L'INFECTION PAR LE VIH-1_{89.6}

Les cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont été mises en culture dans des plaques 96 puits. Le jour suivant, les molécules ont été mises en présence des deux types cellulaires 15 minutes avant l'infection (duplicata, DMEM complet). 100 μ L de VIH-1_{89.6} ont été ajoutés dans chacun des puits à des dilutions telles que présentées ci-haut. Les cellules ont été lysées 48h post-infection dans un tampon composé de 0,2% Triton-X100 (VWR) et de PBS, pour être ensuite congelées à - 20°C afin de briser les noyaux. L'activité de la β -galactosidase a été quantifiée à l'aide d'un test au chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG). Cette molécule sert de substrat à la β -galactosidase qui la convertit en galactose et chlorophénol rouge, un chromophore produisant une couleur rouge foncé. 100 μ L d'une solution de CPRG 2X contenant 0,412mM de CPRG (Roche), 0,2% de Triton-X100 et 0,1% d'acide 3-hydroxy-alpha-mercapto-beta-methylcinnamique dans du PBS, a été ajouté au lysat cellulaire. Les lysats ont été incubés à 30°C pendant 4 à 24 heures. Le chlorophénol rouge a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm.

4.5 ESSAI DE MIGRATION CELLULAIRE INDUITE PAR LE COUPLE CXCR4/SDF-1

Le comportement migratoire des cellules REH en présence de SDF-1 et des inhibiteurs de CXCR4 a été évalué par un test de chimiotaxie. Les cellules ont été préalablement marquées à la calcéine AM à 2 μ L/mL (Invitrogen). Les cellules REH ont été placées en présence de l'inhibiteur dans le compartiment

supérieur d'une plaque de chimiotaxie ChemoTx (NeuroProbe). La partie inférieure de la plaque contient la chimiokine SDF-1 en présence de l'inhibiteur testé. Les parties supérieures et inférieures de la plaque ChemoTx sont séparées par un filtre muni de pores de 5 μM de diamètre. Le pourcentage de migration des cellules REH a été évalué par quantification des cellules ayant migré dans le compartiment inférieur de la plaque de ChemoTx. La quantification des cellules a eut lieu grâce à l'émission de fluorescence de la calcéïne, subséquente à l'étape de lyse cellulaire au cours de laquelle le calcéïne AM a été hydrolysée en calcéïne fluorescente par des estérases intracellulaires. L'acquisition des données a eut lieu grâce au lecteur de fluorescence MITHRAS LB940 (Berthold).

4.6 ESSAI DE LIAISON À CXCR4

Des dilutions sérielles ont été faites dans du tampon de liaison (50 mM HEPES pH 7,4, 5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 0,2% BSA) avec les différents peptides afin d'avoir des concentrations finales par puits variant de 5×10^{-4} M à 5×10^{-14} M. Des préparations commerciales de membranes de cellules CHEM-1 exprimant le récepteur CXCR4 (Millipore) ont été utilisées, à raison de 5 μg /puits et de 2,5 μg /puits, respectivement, dans du tampon de liaison. Afin de mesurer la capacité de liaison des peptides avec leur ligand cible, une dilution de ^{125}I -SDF-1 (PerkinElmer) dans du tampon de liaison a été utilisée. Dans un puits d'une plaque 96 puits, 10 μL de chacune des dilutions des peptides ont été placés avec 10 μL de la dilution de membranes et 20 μL de la dilution de ^{125}I -SDF-1 à raison de 50 pM/puits. À la suite d'une incubation de 1,5 h sur glace, le contenu des puits a été transféré sur un filtre fait de microfibres de borosilicate (Molecular Devices Corporation) préalablement incubé pour 30 minutes dans une solution de 0,33% poly(éthylèneimine) et lavé pour 30 minutes dans une solution contenant 50 mM HEPES pH 7,4 et 0,5% BSA. Lors du transfert sur le filtre, chaque puits a été lavé avec une solution de lavage (50 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl , 0,1% BSA) en utilisant un Combi Cell HARVESTER

(Molecular Devices Corporation). Chaque filtre sur lequel a été transféré le contenu d'un puits a été ensuite placé dans un tube de polypropylène 12X75 mm, et 1 mL de liquide à scintillation (UniverSol, MP Biomedicals) a été ajouté dans chaque tube. La radioactivité dans chaque puits a été ensuite mesurée en CPM (*counts per minute*) à l'aide d'un compteur gamma (CobraII Auto-Gamma, model E5002, Packard).

5 RÉSULTATS DE L'INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4

Le but de notre étude était de mettre au point des inhibiteurs d'entrée virale de CXCR4 allostériques capables de lier le récepteur à un site différent de celui du SDF-1. L'objectif général poursuivi était d'identifier des composés n'interférant pas avec les fonctions naturelles du récepteur.

Trois pistes ont été suivies. La première portait sur l'étude de dérivés du puissant inhibiteur de faible poids moléculaire, le T140, la deuxième sur l'étude de dérivé de la chimiokine SDF-1 et enfin la troisième sur l'étude de dérivés peptidiques mimant des portions transmembranaires et extracellulaires de CXCR4.

5.1 DÉRIVÉS DU T140

5.1.1 EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS DU T140

5.1.1.1 TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS DU T140

Le pouvoir antiviral des dérivés du T140 est testé en essai d'infection. Des cellules rapporteuses Hela P4 exprimant le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4 ont été traitées avec des quantités croissantes d'inhibiteur préalablement à l'infection avec le VIH-1_{89.6}. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport au contrôle positif qui découle de l'infection seule (en absence d'inhibiteur). La valeur du background correspondant au contrôle négatif (cellules seules) est retranchée

Les dérivés du T140 ont été testés en essai d'infection afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4. La **Figure 5.1** montre que toutes les molécules dérivés du T140 inhibent de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles Hela P4 par le VIH_{89.6} avec des EC₅₀ variant de 0.2 à 50 μ M (Tableau 2). Cet essai d'infection résultant d'une unique expérience, il devrait être répété.

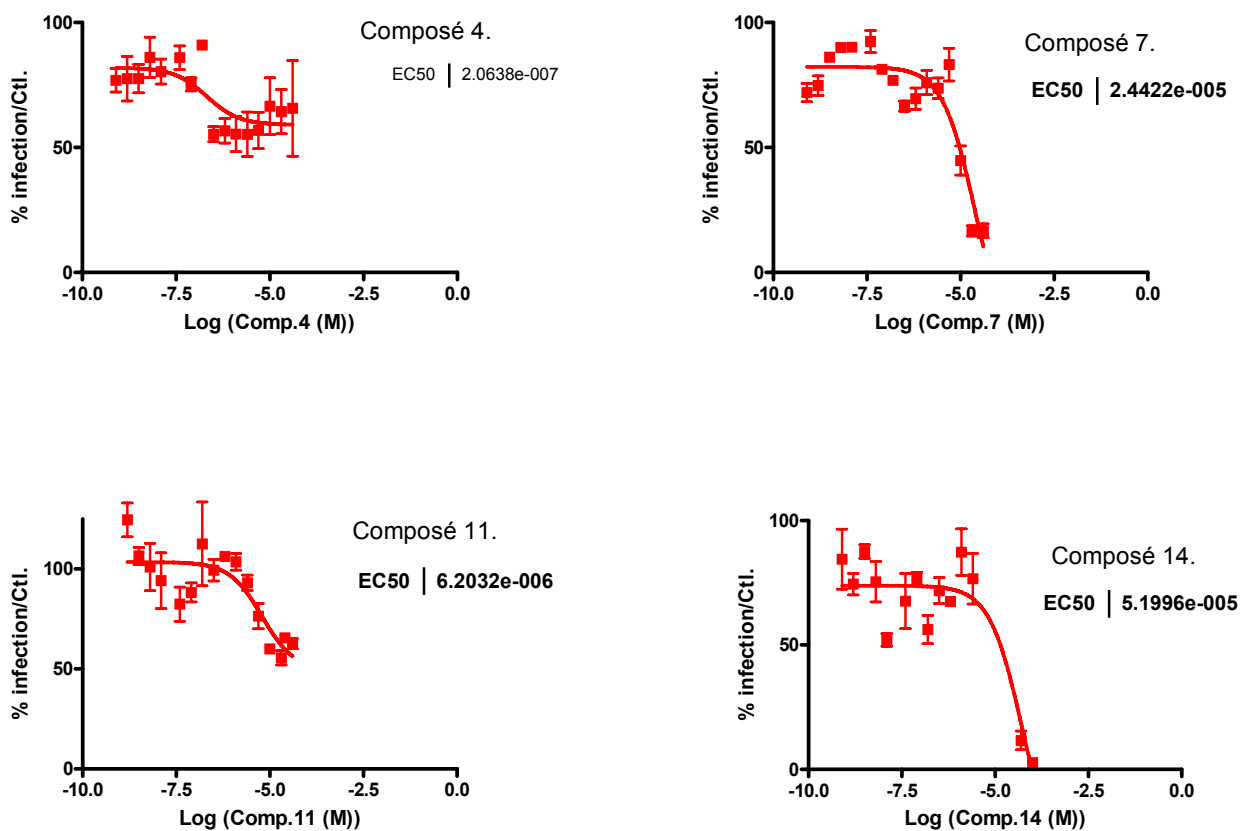


Figure 5.1 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés du T140. Des cellules Hela P4 ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante des différents dérivés du T140. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur. Graphes représentatifs d'une unique expérience réalisée en triplicata.

	EC₅₀ Antiviraux Expérimentaux (M)	EC₅₀ Antiviraux (M) (Tamamura & al. 2006)
Dérivé 4	2,06E-07	2,20E-05
Dérivé 7	2,44E-05	1,70E-06
Dérivé 11	6,20E-06	7,70E-06
Dérivé 14	5,20E-05	6,00E-06
FC 131		7,30E-08
T 140		2,60E-08

Tableau 2: Comparaison des activités antivirales des dérivés du T140 issus de la littérature et expérimentales.

5.1.1.2 TEST DE L'INTERFÉRENCE SUR LA CHIMIOTAXIE DES DÉRIVÉS DU T140

Les dérivés du T140 ont été testés en essai de migration cellulaire afin d'évaluer leur interférence avec une des fonctions naturelles CXCR4. Des cellules REH exprimant le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4 ont été traitées avec des quantités croissantes d'inhibiteur puis mises à migrer en présence de SDF-1. Le niveau de migration a été évalué par mesure de fluorescence émise par les cellules migrantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de migration par rapport au contrôle positif qui découle de la migration maximale (en absence d'inhibiteur). La valeur du background correspondant au contrôle négatif (cellules seules) est retranchée

La **Figure 5.2** montre que toutes les molécules dérivées du T140 inhibent de façon dose dépendante la migration des cellules REH avec des EC_{50} variant de 0.1 à 30 μ M (Tableau 3). Le niveau de compétition avec la liaison du SDF-1 se retrouve alors être différent pour chacun des dérivés.

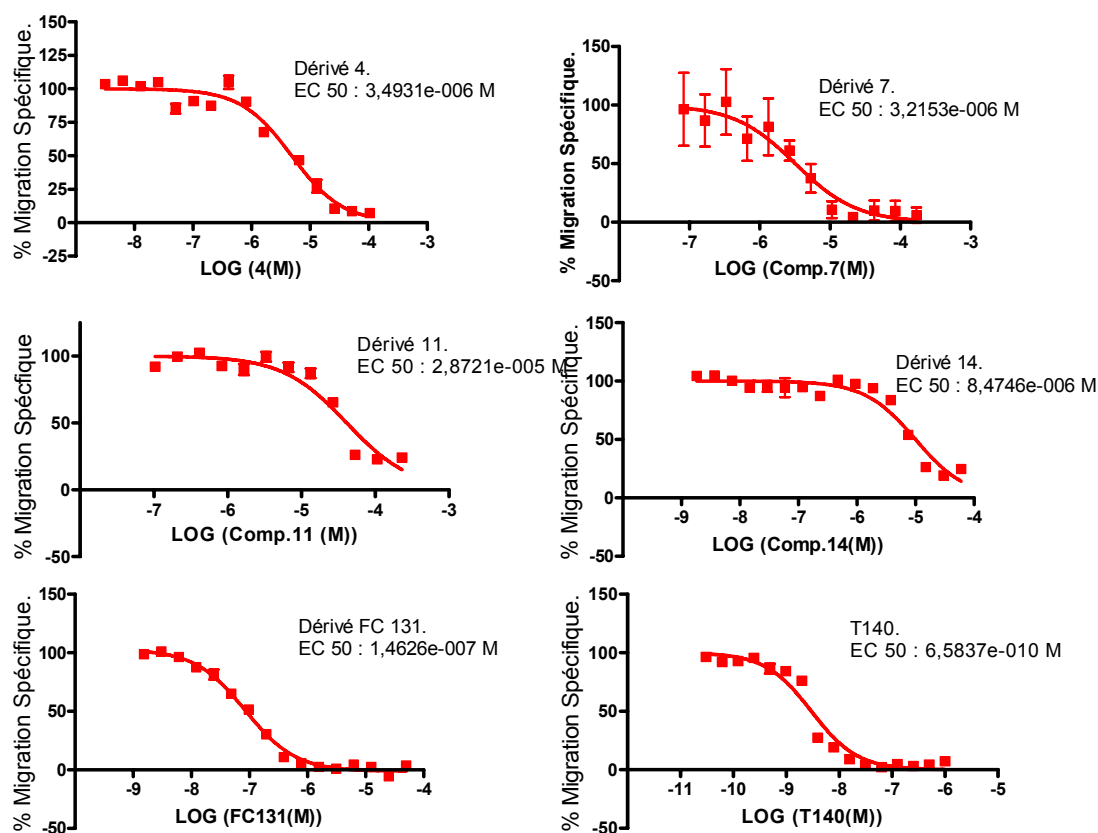


Figure 5.2 : Inhibition de la migration cellulaire par les dérivés du T140. Des cellules REH ont été mises en présence de doses croissantes des dérivés du T140 et mise à migrer en plaque ChemoTx en réponse à 10 nM de SDF-1 durant 4 heures à 37°C. Graphes représentatifs de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata pour les dérivés 4 et 11. Graphes représentatifs de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata pour les dérivés 7, 14, FC 131 et T140.

	EC₅₀ Anti-Chimiotaxie (M)
Dérivé 4	3,49 ± 1.3 E-06
Dérivé 7	3,22 ± 0.5 E-06
Dérivé 11	2,87 ± 1.2 E-05
Dérivé 14	8,47 ± 1.5 E-06
Dérivé FC131	1,46 ± 0.7 E-07
T 140	6,58 ± 0.8 E-10

Tableau 3 : Activités anti-chimiotactiques des dérivés du T140. Moyennes de 2 expériences réalisées en triplicata pour les dérivés 4 et 11. Moyennes de 3 expériences réalisées en triplicata pour les dérivés 7, 14, FC 131 et T140.

5.1.2 INTERACTION DES DÉRIVÉS DU T140 AVEC CXCR4

5.1.2.1 COMPÉTITION ENTRE LES DÉRIVÉS DU T140 ET LE RADIOLIGAND ^{125}I -SDF-1

Les dérivés du T140 ont été testés en essai de liaison au récepteur afin d'évaluer leur capacité ou non à compétitionner avec la liaison du ligand naturel de CXCR4, la chimiokine SDF-1. On a procédé à un essai de compétition de liaison au récepteur entre la chimiokine SDF-1 radiomarquée à l'iode 125 et le dérivé du T140 non marqué. Les cellules ou des préparations membranaires commerciales exprimant CXCR4 ont été traitées avec des quantités croissantes d'inhibiteur en présence de 50 pM de ^{125}I -SDF-1 puis laissées 1.5 heures sur glace. Après une étape de lavage, la radioactivité émise par les chimiokines liées au récepteur a été mesurée à l'aide d'un compteur de rayons gamma.

La **Figure 5.3 (A) et (B)** montre que le T140 et son dérivé le FC 131 compétitionnent de façon dose dépendante avec la liaison du ^{125}I -SDF-1 à CXCR4 avec des IC_{50} respectives de 10 et 20 nM. En **(C)**, le dérivé 11 montre une activité compétitive pour la liaison du ^{125}I -SDF-1 à la concentration saturante de 100 μM , tandis que les dérivés 7 et 14 montrent une absence de compétition avec le ^{125}I -SDF-1 à la concentration saturante de 100 μM .

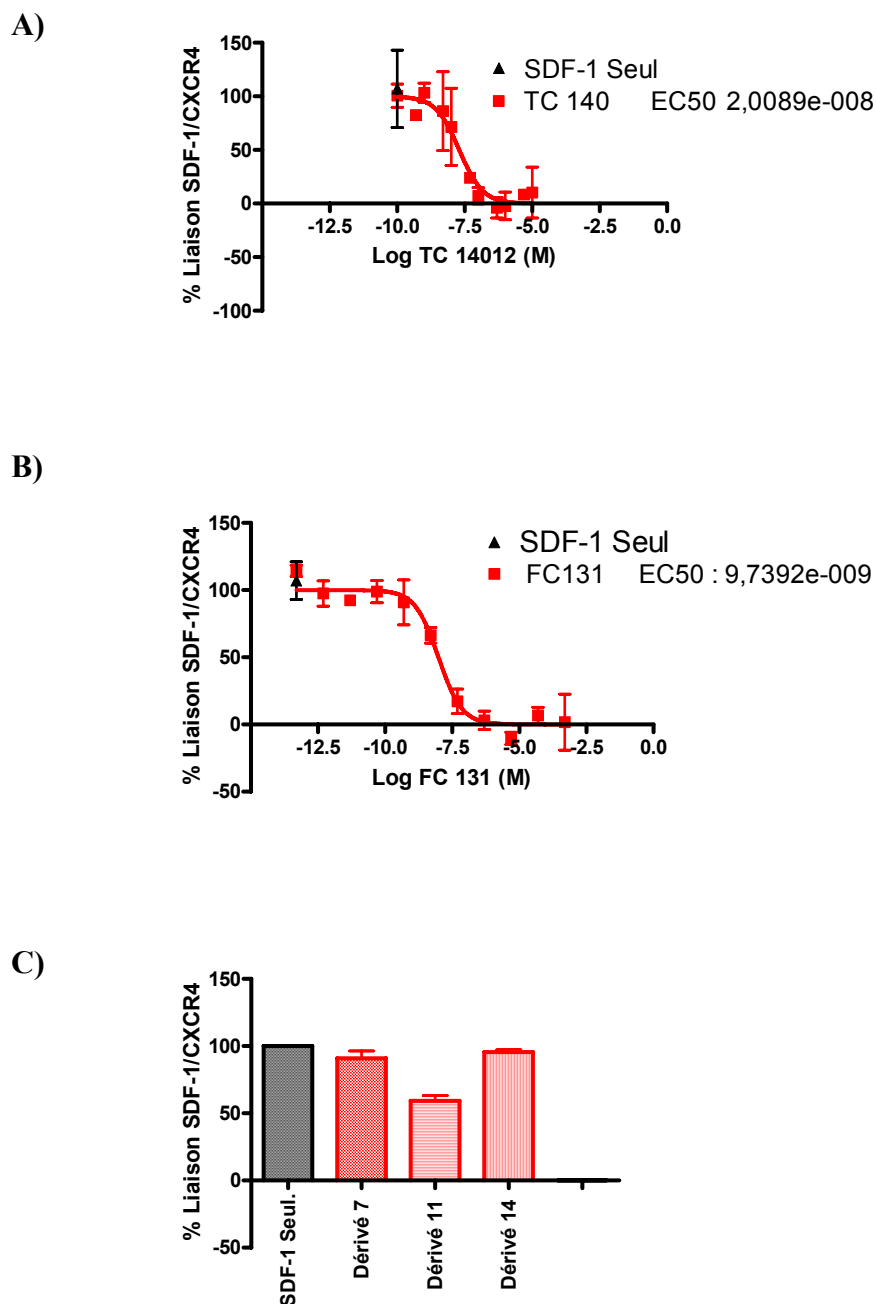


Figure 5.3 : Inhibition de la liaison du ^{125}I -SDF-1 à CXCR4 par les dérivés du T140. Des membranes de cellules CHEM-1 exprimant CXCR4 ont été mises en présence de quantités croissantes de (A) T140 (B) de FC 131 (C) de 100 μM des dérivés 7, 11 et 14 en présence de 50 pM/ ^{125}I -SDF-1. La radioactivité résiduelle a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma. Graphes représentatifs de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata.

5.1.2.2 RÉSIDUS CRITIQUES DE CXCR4 POUR L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DU T140

Le T140 a été testé en essai d'infection sur les formes sauvage et mutantes de CXCR4 afin de déterminer les résidus critiques du récepteur nécessaires à l'activité antivirale de la molécule. Des cellules U373MG n'exprimant pas CXCR4 ont été transfectées avec 2 µg des formes sauvages et mutantes puis infectées post-48heures par le VIH-1_{89,6} en présence d'une dose croissante de T140. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β-galactosidase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport au contrôle positif qui découle de l'infection seule (en absence d'inhibiteur). La valeur du background correspondant au contrôle négatif (cellules seules) est retranchée

Le graphe est représentatif d'une unique expérience réalisée en triplicata (Figure 5.4). X4wt : CXCR4 sauvage; D171N : Acide Aspartique en position 171 remplacé par une Asparagine; R188A : Arginine en position 188 remplacée par une Alanine; G207A : Glycine en position 207 remplacée par une Alanine; D262A : Acide Aspartique en position 262 remplacé par une Alanine. L'effet de la conversion en alanine des résidus G207 et D262 induit une perte de la charge aux positions mutées sur la chaîne polypeptidique. Le même effet a lieu pour les mutants D171N et R188A.

La **Figure 5.4** montre que la forme sauvage du récepteur et le mutant G207A sont sensibles à l'inhibiteur, tandis que les mutants D171N, R188A et D262A sont résistants à ce dernier, ce qui indique que ces résidus sont critiques pour la liaison du T140 à CXCR4. Le résidu glycine à la position 207 ne semble pas être critique pour la liaison du T140 à CXCR4. Cependant, cet essai d'infection résultant d'une unique expérience, elle devrait être répétée avec le T140 dans un premier temps et les dérivés de la molécule par la suite.

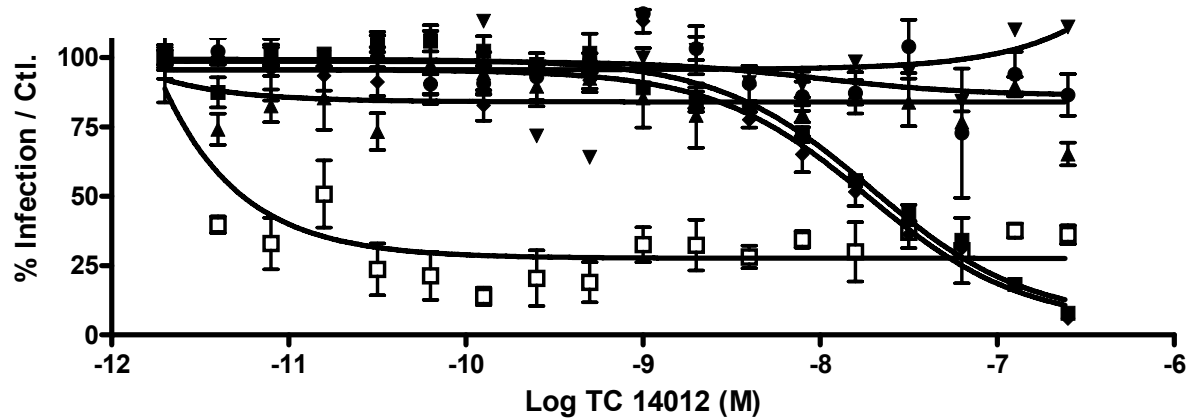


Figure 5.4: Activité antivirale du T140 sur la fonction coréceptrice de CXCR4 sauvage et mutant. (■ CXCR4 sauvage ▲ D171N ▼ R188A ● D262A ◆ G207A □ Ctl: vecteur vide.)

5.2 DÉRIVÉS DU SDF-1

5.2.1 EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS DU SDF-1

5.2.1.1 TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS DU SDF-1

L'étude de Heveker & al. montre que le ligand naturel de CXCR4, le SDF-1 semble posséder une topologie moléculaire dans laquelle existe une dissociation entre capacité de signalisation et de protection antirétrovirale [108]. Plusieurs dérivés du SDF-1 sont synthétisés à partir de la molécule native par raccourcissement peptidique afin de déterminer les résidus impliqués dans la protection antivirale.

Le pouvoir antiviral des dérivés du SDF-1 a été testé en essai d'infection. Des cellules rapporteuses Hela P4 exprimant le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4 sont traitées avec des quantités croissantes du dérivé préalablement à l'infection avec le VIH-1_{89.6}. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport au contrôle positif qui découle de l'infection seule (en absence d'inhibiteur). La valeur du background correspondant au contrôle négatif (cellules seules) est retranchée.

Les dérivés du SDF-1 ont été testés en essai d'infection afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4. Les peptides testés correspondent à une molécule initiale comprenant les 14 premiers acides aminés du SDF-1 (KPVLSYRCPCRF) et des dérivés de cette dernière raccourcis et/ou mutés. La **Figure 5.5** montre que toutes les molécules dérivés du SDF-1 inhibent de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles Hela P4 par le VIH_{89.6} avec des EC₅₀ variant de 20 à 100 μ M. Les dérivés du SDF-1 présentent tous une activité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4 sans lien de corrélation entre activité antivirale et la taille peptidique.

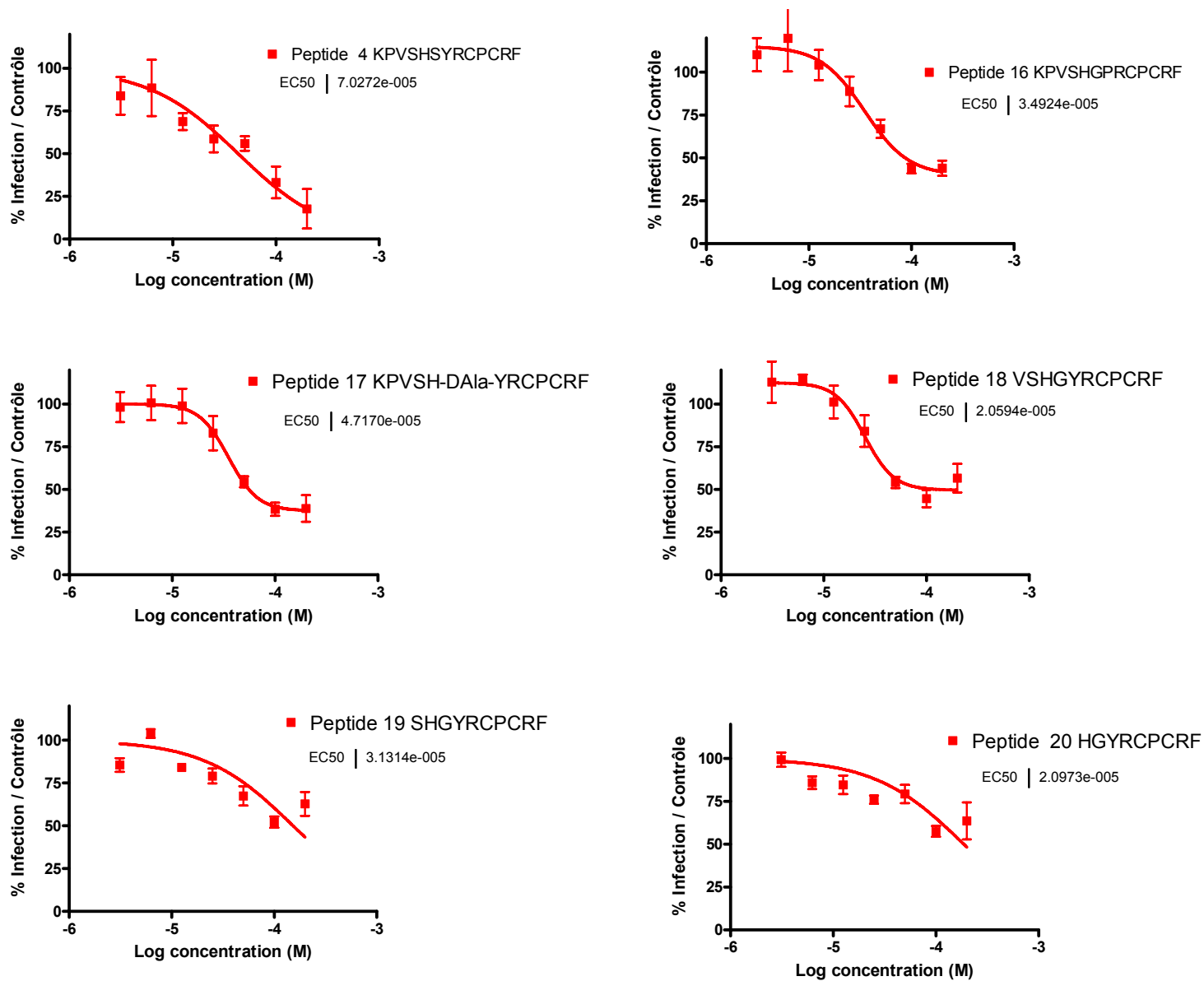


Figure 5.5 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés de la chimiokine SDF-1. Des cellules Hela P4 ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante des différents peptides. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur. Graphes représentatifs de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata.

5.2.1.2 TEST DE L'INTERFÉRENCE SUR LA CHIMIOTAXIE DES DÉRIVÉS DU SDF-1

Les dérivés du SDF-1 ont été testés en essai de migration cellulaire afin d'évaluer leur interférence avec les fonctions naturelles de CXCR4. La **Figure 5.6** montre que le dérivé n°4 du SDF-1 inhibe de façon dose dépendante la migration des cellules REH. Cependant, le solvant (DMSO) semble de manière similaire inhiber la migration cellulaire. On ne peut donc distinguer entre l'effet du peptide et celui du solvant et on ne peut pas conclure quant à l'effet du dérivé du SDF-1 sur la migration cellulaire. Aucune autre alternative de solvant n'a été trouvée pour remplacer le DMSO puisque ce dernier est utilisé pour ses propriétés de solubilisation de peptides hydrophobes (mais également hydrophiles et chargés) [125].

Les tests de migration cellulaire avec les autres dérivés du SDF-1 ont été abandonnés. Une alternative à tester à l'avenir serait de réaliser des stocks peptidiques solubilisés dans le DMSO à raison de 5-10 mM puis une étape de dilution des solutions stocks dans une solution isotonique de PBS.

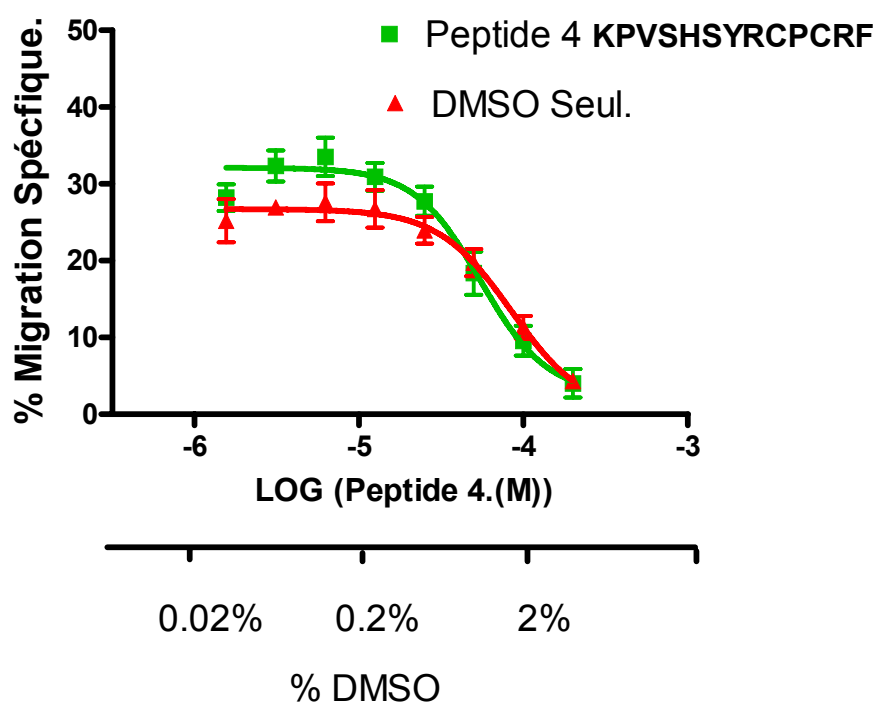


Figure 5.6 : Inhibition de la migration cellulaire par un dérivé du SDF-1. Des cellules REH ont été mises en présence de doses croissantes du dérivé n° 4 du SDF-1 et mises à migrer en plaque ChemoTx en réponse à 10 nM de SDF-1 durant 4 heures à 37°C. Graphe représentatif d'une expérience unique réalisée en triplicata.

5.3 DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4

L'étude de Tarasova & al. suggère que des peptides mimant des portions transmembranaires de CXCR4 auraient la capacité de rendre le récepteur inactif [106]. La liaison d'un tel peptide au récepteur induirait des ruptures d'interactions dans les segments transmembranaires du récepteur (Figure 5.7).

Nous avons choisi de suivre cette hypothèse en testant la capacité de protection antivirale de peptides issus de la portion N-terminale, du quatrième segment transmembranaire et des boucles extracellulaires de CXCR4 (Figure 5.8). La sélectivité des molécules envers CXCR4 n'étant pas établie (à la différence des dérivés du T140 et du SDF-1), nous avons choisi de tester la sélectivité en essai d'infection en utilisant deux lignées cellulaires exprimant respectivement CXCR4 (U373MG X4) et CCR5 (U373MG R5).

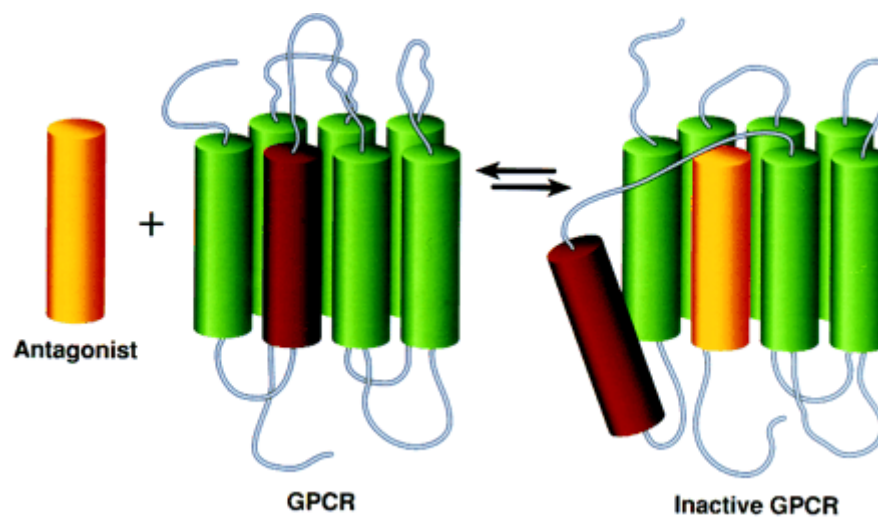


Figure 5.7 : Mécanisme hypothétique d'inactivation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) par un peptide mimant une portion transmembranaire. Tiré de Tarasova & al. [106].

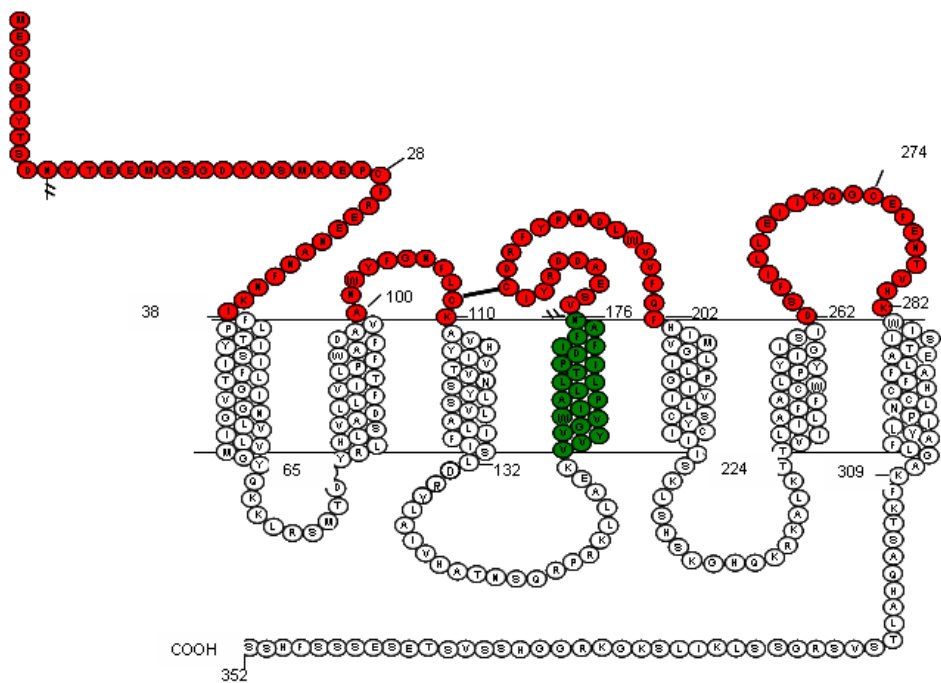


Figure 5.8 : Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4 et séquence des dérivés peptidiques des boucles extracellulaires (rouge) et du quatrième segment transmembranaire (vert). Tiré de Brelot & al. [126].

5.3.1 EFFET FONCTIONNEL DES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4

5.3.1.1 TEST DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4

Le pouvoir antiviral des dérivés du quatrième segment transmembranaire de CXCR4 a été testé en essai d'infection. Des cellules rapporteuses U373MG X4 et U373MG R5 exprimant le récepteur CD4 et respectivement les corécepteurs CXCR4 et CCR5 ont été traitées avec des quantités croissantes du dérivé préalablement à l'infection avec le VIH-1_{89.6}. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport au contrôle positif qui découle de l'infection seule (en absence d'inhibiteur). La valeur du background correspondant au contrôle négatif (cellules seules) est retranchée

Les dérivés du quatrième segment transmembranaire de CXCR4 sont testés en essai d'infection afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4. Les peptides testés correspondent à une molécule initiale comprenant les 15 acides aminés des positions 162 à 176 du quatrième segment transmembranaire de CXCR4 (IPALLLTIPDFIFAN) et des dérivés réduits de cette dernière. La **Figure 5.9** montre que toutes les molécules inhibent de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles exprimant CXCR4 (U373MG X4) et CCR5 (U373MG R5) infectées par le VIH _{89.6} avec un EC₅₀ de l'ordre de la centaine de micromolaire. Peu de sélectivité envers CXCR4 est observée puisque les dérivés peptidiques inhibent l'infection sur la lignée U373MG R5 exprimant le corécepteur CCR5. On observe néanmoins une efficacité antivirale supérieure de l'ensemble des peptides sur CXCR4 vis-à-vis de celle sur CCR5.

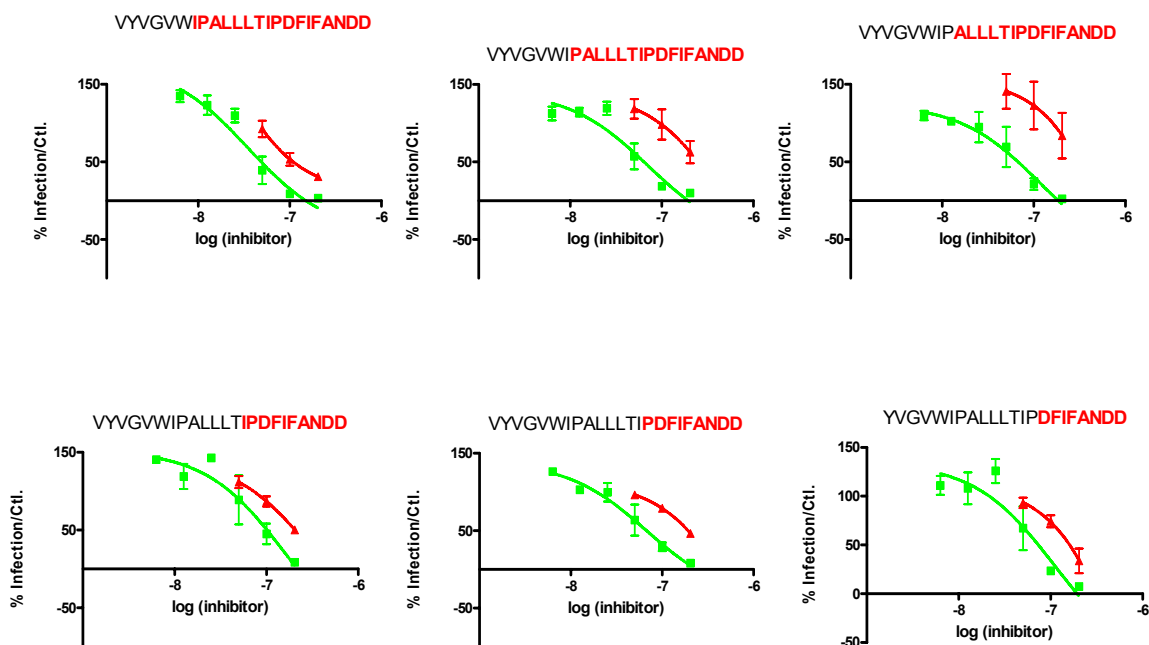


Figure 5.9 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés peptidiques du quatrième segment transmembranaire de CXCR4. Des cellules U373MG X4.15 (■) ou U373MG R5.3 (▲) ont été infectées par le VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante des différents raccourcis peptidiques (rouge). Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur. Graphes représentatifs d'une unique expérience réalisée en duplicata.

Les dérivés de la portion N-terminale de CXCR4 ont été testés en essai d'infection afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4. La **Figure 5.10** montre que les molécules EGISIYTSDNY et ISIIYTSDNY correspondant respectivement aux résidus des positions 2 à 11 et 4 à 11 de la portion N-terminale de CXCR4, inhibent toutes deux de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles exprimant CXCR4 (U373MG X4) et CCR5 (U373MG R5) infectées par le VIH_{89.6} avec un EC₅₀ de l'ordre de la centaine de micromolaires. Peu de sélectivité envers CXCR4 est observée puisque les dérivés peptidiques inhibent l'infection sur la lignée U373MG R5 exprimant le corécepteur CCR5. On observe une efficacité antivirale supérieure du peptide ISIIYTSDNY sur CXCR4 et du peptide EGISIYTSDNY sur CCR5.

Le dérivé EENANFNKIFL, comprenant les résidus des positions 42 à 50, ne montre aucune activité antivirale.

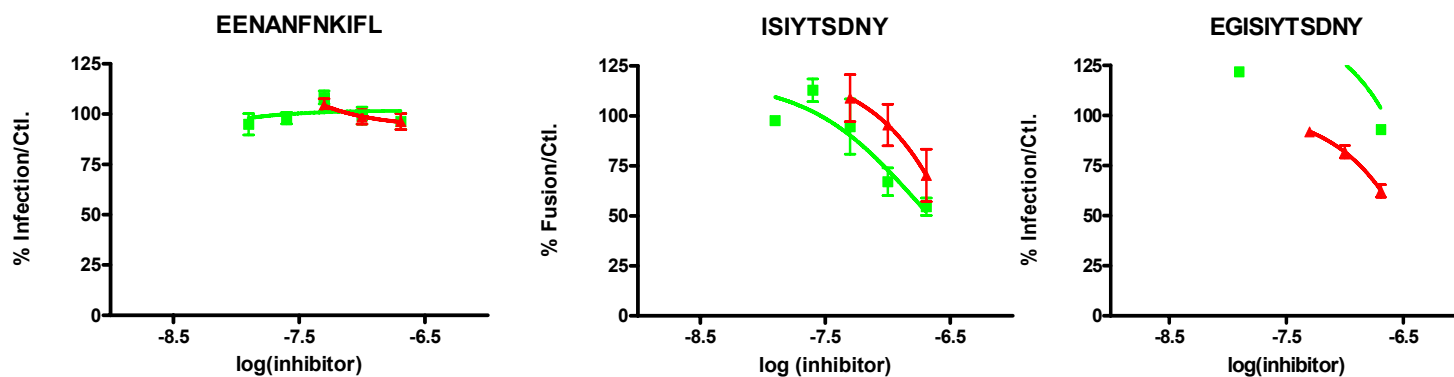


Figure 5.10 : Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les dérivés peptidiques de l'extrémité N-terminale de CXCR4. Des cellules U373MG X4.15 (■) ou U373MG R5.3 (▲) ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante des différents peptides. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur. Graphes représentatifs d'une unique expérience réalisée en duplicata.

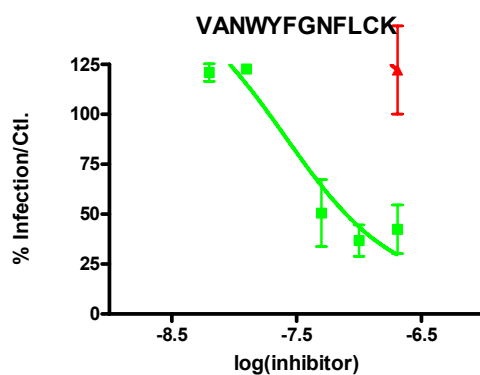
Les dérivés des boucles extracellulaires de CXCR4 ont été testés en essai d'infection afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de l'activité coréceptrice de CXCR4. La **Figure 5.11** montre en a) le dérivé VANWYFGNFLCK comprenant les résidus des positions 99 à 110 de la première boucle extracellulaire inhibe de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles exprimant CXCR4 (U373MG X4) et CCR5 (U373MG R5) infectées par le VIH_{89.6} avec un EC₅₀ de l'ordre de la centaine de micromolaire. Le peptide présente une sélectivité antivirale exclusive envers CXCR4 puisque qu'il n'inhibe pas l'infection sur la lignée U373MG R5 exprimant le corécepteur CCR5.

En b) le dérivé FANVSEADDRY comprenant les résidus des positions 187 à 197 et le dérivé DRFYPNDLWVVV inhibent tous deux de façon dose dépendante l'infection des cellules cibles exprimant CXCR4 (U373MG X4) et CCR5 (U373MG R5) infectées par le VIH_{89.6} avec un EC₅₀ de l'ordre de la centaine de micromolaire.

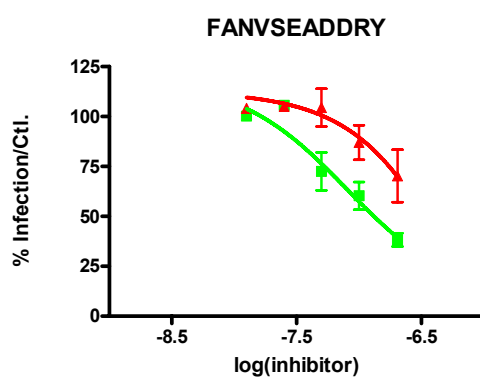
En c) Le dérivé TVHKWISITEAL, comprenant les résidus des positions 279 à 290, ne présente aucune activité antivirale.

Le faible pouvoir antiviral des peptides issus du quatrième segment transmembranaire, des boucles extracellulaires et de la portion N-terminale de CXCR4 nous a conduits à ne pas poursuivre le projet impliquant ces peptides. A la différence de l'étude de Tarasova & al. peu de sélectivité des peptides issus des segments transmembranaires de CXCR4 pour leur récepteur d'origine n'est observée [106]. Le dérivé VANWYFGNFLCK est le seul à présenter une sélectivité envers CXCR4 et est toujours en cours d'études.

a)



b)



c)

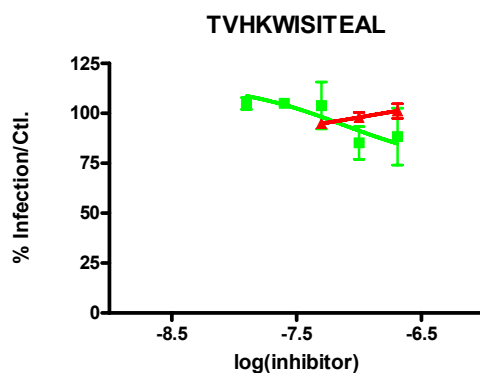


Figure 5.11: Inhibition de l'infection du VIH-1_{89,6} par les dérivés peptidiques des boucles extracellulaires de CXCR4. Des cellules U373MG X4.15 (■) ou U373MG R5.3 (▲) ont été infectées par VIH-1_{89,6} en présence d'une dose croissante des différents peptides. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur. Les dérivés peptidiques sont issus a) de la première b) deuxième c) et la troisième boucle extracellulaire. Graphes représentatifs d'une unique expérience réalisée en duplicata.

6 DISCUSSION

6.1 INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS DU T140

Le point de départ de l'étude réside dans la nécessité de mettre au point des inhibiteurs d'entrée du VIH ciblant sélectivement CXCR4 et n'interférant pas avec les fonctions naturelles de ce dernier. Nous avons choisi d'investiguer plusieurs dérivés du puissant bloqueur de CXCR4 de faible poids moléculaire, le T140. Le T140 étant à la fois un bloqueur de l'entrée virale et de la liaison du SDF-1 à CXCR4, notre objectif était d'identifier parmi les dérivés de la molécule certains capables de maintenir une activité antivirale tout en permettant la liaison du SDF-1 au récepteur et sa signalisation subséquente.

Activités antivirales et anti-chimiotactiques des dérivés du T140.

Le T140, les dérivés 4, 7, 11,14 et FC131 ont été testés en essai d'infection dans un premier temps, puis sur un essai de migration cellulaire induite par le couple CXCR4/SDF-1 dans un second temps.

Afin de comparer les activités antivirales et anti-chimiotactiques des dérivés du T140, il a été utile de représenter graphiquement les IC_{50} antivirales et IC_{50} anti-chimiotaxie obtenues. Les IC_{50} antivirales sont représentées en abscisses et les IC_{50} anti-chimiotaxie en ordonnées.

La Figure 6.1 comprend nos propre données pour les IC_{50} anti-chimiotaxie tandis que les IC_{50} antivirales sont celles correspondant à l'étude de Tamamura & al.[121] choisies pour leur reproductibilité supérieure à celle de nos propres données expérimentales.

Les dérivés qui présentent le profil le plus intéressant sont ceux qui possèdent une forte activité antivirale et une faible activité anti-chimiotactique (IC_{50} antivirale $<$ IC_{50} anti-chimiotaxie). Une molécule hypothétique A qui présenterait une forte activité antivirale et faible activité anti-chimiotactique correspondrait à la molécule recherchée puisqu'elle est permettrait de protéger de l'infection rétrovirale tout en permettant la liaison du SDF-1 à CXCR4 et la migration cellulaire subséquente. A l'inverse, une molécule hypothétique B qui présenterait une faible activité antivirale et une forte activité anti-chimiotactique posséderait l'effet contraire du but recherché. Le T140 représente une de ces molécules puisque son effet inhibiteur de la migration cellulaire est supérieur à son activité antivirale (IC_{50} antiviral $>$ IC_{50} anti-chimiotaxie). Les dérivés 4, 7, 11, 14 et FC131 présentent une activité antivirale et anti-chimiotactique équivalentes (IC_{50} antiviral \sim IC_{50} anti-chimiotaxie). Aucun des dérivés du T140 ne correspond donc au profil que nous recherchions (IC_{50} antiviral $<$ IC_{50} anti-chimiotaxie).

La Figure 6.2 comprend nos propres données pour les IC_{50} anti-chimiotaxie ainsi que pour les IC_{50} antivirales. Le dérivé 4 montre un profil intéressant puisque son activité antivirale est supérieure à son activité anti-chimiotaxie (IC_{50} antiviral $<$ IC_{50} anti-chimiotaxie) tandis que les dérivés 7, 11, 14 conservent le même profil avec des activités antivirales et anti-chimiotactiques équivalentes (IC_{50} antiviral \sim IC_{50} anti-chimiotaxie).

Les différences d'activités antivirales des dérivés du T140 entre nos propres données expérimentales et les données de l'étude de Tamamura & al. [121] peuvent être imputables à la divergence des systèmes expérimentaux utilisés. Les IC_{50} antivirales qui correspondent aux données de l'étude de Tamamura & al. ont été obtenues par le bromure de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (ou test MTT) en mesurant l'effet inhibiteur de la molécule sur la cytopathogénecite induite sur une lignée de lymphocytes T humains MT4 par le virus X4-tropique (HIV-1IIIB). Nos propres données expérimentales ont

été obtenues en dosant l'activité de la β -galactosidase résultant de l'infection de cellules Hela P4 par la souche VIH_{89.6}. De façon surprenante, le T140 montre un IC₅₀ antivirale variant de 3,5 à 26 nM dans deux études réalisées par la même équipe et mettant en jeu le test MTT [121, 127].

Les différences d'activités antivirales (mais également anti-chimiotactiques) entre les dérivés du T140 pourraient être dues à des différences d'affinités pour le récepteur. Ces différences d'affinités pourraient être causées par une liaison à différents résidus sur CXCR4 au sein d'un même site de liaison (ou poche de liaison).

Activité compétitive des dérivés du T140 avec la liaison du SDF-1 à CXCR4.

Le T140 et les dérivés 7, 11, 14 et FC131 ont été testés sur un test de compétition de la liaison sur CXCR4 du radioligand ¹²⁵I-SDF-1. Les dérivés du T140 montrent des profils de compétition différents : tandis que certains permettent la liaison du SDF-1 à CXCR4, d'autres l'empêchent (Figure 5.3).

L'hypothèse qui permet d'expliquer ce comportement compétitif différent est que les dérivés se lient sur un site allostérique (différent du site orthostérique) et induisent différentes stabilisations conformationnelles du récepteur. L'étude de Percherancier & al. montre en effet que le T140 stabilise l'homodimère de CXCR4 dans une conformation particulière, spécifique à l'inhibiteur [67].

Le T140, le FC131 et le dérivé 11 induisent une stabilisation conformationnelle du récepteur incompatible avec la liaison du SDF-1. Les dérivés 7 et 14, quant à eux, induisent une stabilisation conformationnelle du récepteur compatible avec la liaison du SDF-1. Bien que les dérivés 7 et 14 permettent la liaison du SDF-1 au récepteur, la stabilisation conformationnelle qu'ils induisent serait incompatible avec une activité signalisatrice qui permet la migration cellulaire.

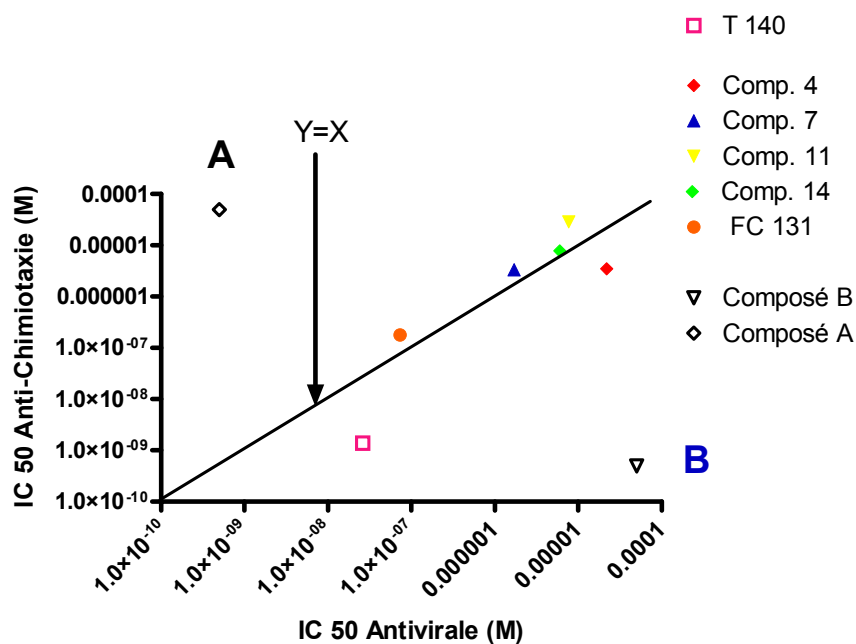


Figure 6.1 : Activité antivirale versus anti-chimiotactique des dérivés du T140. Les IC₅₀ antivirales correspondent aux données de l'étude de Tamamura & al. [121].

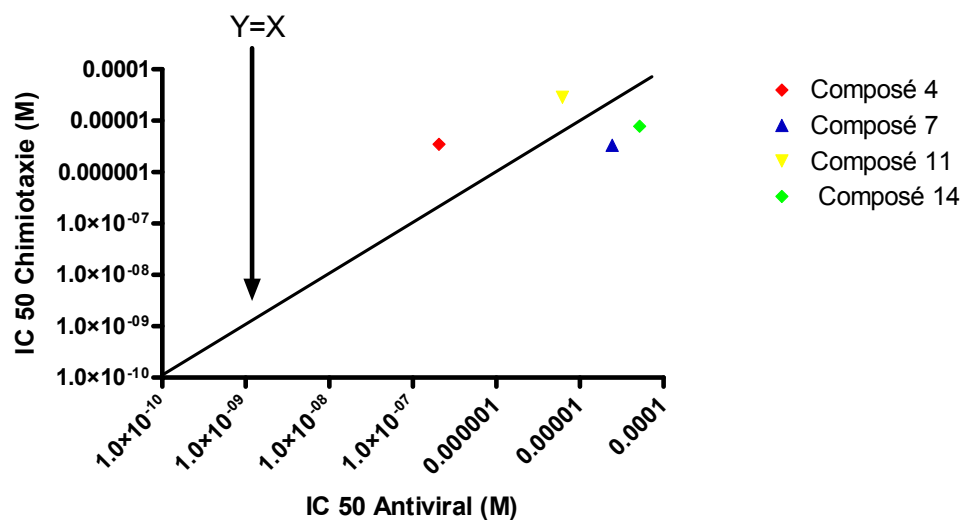


Figure 6.2 : Activité antivirale versus anti-chimiotactique des dérivés du T140. Les IC₅₀ antivirales correspondent aux données de notre propre étude.

Résidus critiques de CXCR4 pour la liaison du T140 et de ses dérivés.

Afin de confirmer que le T140 et ses dérivés se lient sur un site allostérique (différent du site orthostérique), nous avons cherché à déterminer les résidus critiques pour leur liaison sur le récepteur. Nous avons déterminé que les résidus Asp 171, Arg 188, Tyr 190 et Asp 262 étaient critiques pour la liaison du T140 (Figure 5.4). Nos résultats ont été corroborés par les données de Trent & al.[128]. Dans cette étude, les résidus critiques de CXCR4 pour la liaison au T140 sont Asp 171, Arg 188, Tyr 190, Gly 207 et Asp 262 puisque leur conversion en alanine résulte en une perte de l'inhibition de l'activité coréceptrice de CXCR4 induite par le T140 dans un essai de fusion qui met en jeu des cellules QT6 exprimant la glycoprotéine d'enveloppe de la souche VIH_{89,6} et des cellules cibles QT6 transfectées avec les mutants de CXCR4 [128]. La Gly 207 ne semble cependant pas être critique pour la liaison du T140 dans notre système expérimental.

L'identification des résidus critiques de CXCR4 impliqués dans la liaison du T140 (Figure 6.3) renseigne quant au mécanisme d'inhibition de la fonction naturelle du récepteur d'induction de la migration cellulaire. Puisque les résidus critiques pour la liaison du SDF-1 (Glu 14, Glu 15, Tyr 21, Asp 97, Asp 187 et Glu 288) et du T140 (Asp 171, Arg 188, Tyr 190, Gly 207 et Asp 262) sont indépendants, ceci suggère que la compétition pour la liaison au récepteur n'est effectivement pas directe, mais allostérique.

L'hypothèse proposée plus haut dans laquelle une stabilisation conformationnelle du récepteur induite par le T140 et incompatible avec la liaison du SDF-1 est fortement favorisée. Cette stabilisation conformationnelle provoquerait le masquage des résidus critiques de CXCR4 pour la liaison au SDF-1.

La stabilisation conformationnelle induite par le T140 (et ses dérivés) pourrait expliquer leur mécanisme de protection antivirale. La liaison de la gp120 à de multiples sites du récepteur et le faible poids moléculaire du T140 (et de ses dérivés) laissent présumer que leur mécanisme antiviral ne résulte pas d'une compétition directe avec la gp120, comme cela a été aussi conclu dans l'étude de Watson & al.[55] portant sur les inhibiteurs du corécepteur CCR5.

L'hypothèse favorisée est celle d'une liaison simultanée du T140 (ou de ses dérivés) et de la gp120 à CXCR4, mais que le changement conformationnel requis pour l'entrée virale soit bloqué par la stabilisation conformationnelle induite par l'inhibiteur.

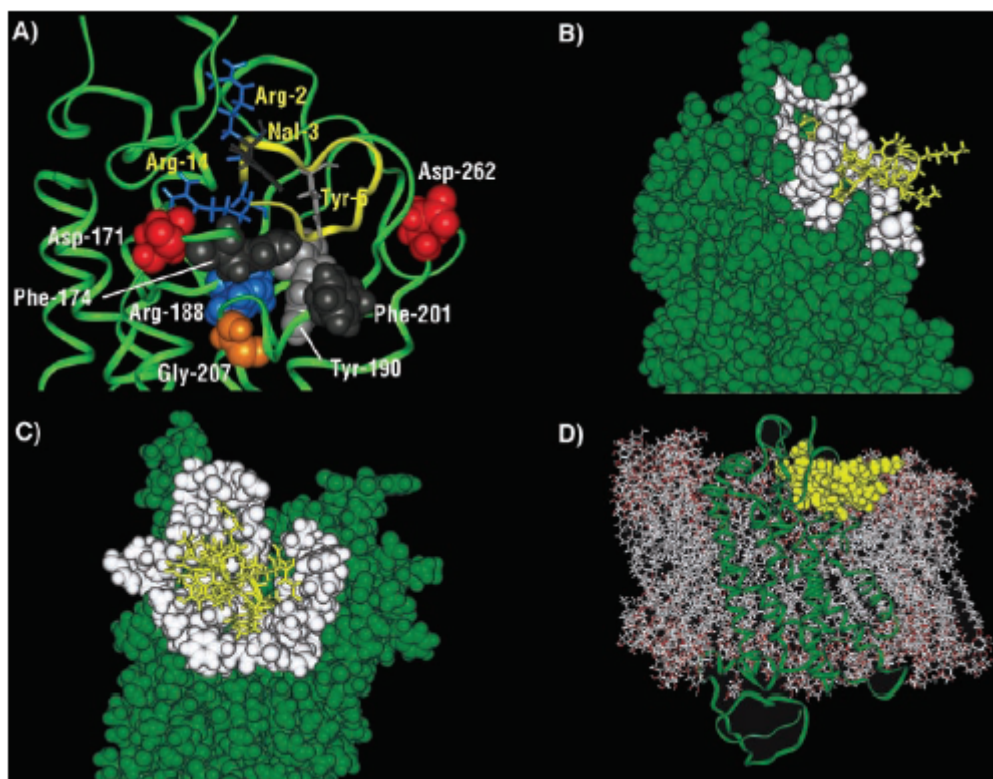


Figure 6.3 : Liaison du T140 à CXCR4. a) Résidus critiques du T140 en jaune / Résidus critiques de CXCR4 en blanc.b) & c) T140 en jaune, CXCR4 en vert, site d'interaction CXCR4/T140 en blanc.d) T140 en jaune, CXCR4 en vert, membrane cellulaire en blanc. Tiré de Trent & al.[128].

6.2 INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DU SDF-1

Le point de départ de l'étude réside dans l'observation que la chimiokine naturelle SDF-1 est capable de protéger de l'infection rétrovirale en se liant à CXCR4. L'étude réalisée par Heveker & al. émet l'hypothèse qu'il est possible de cartographier les structures de la chimiokine responsables de l'effet antiviral et celles responsables d'induire l'activation du récepteur [108]. Le dérivé peptidique du SDF-1, le L5H, retient la meilleure activité antivirale et semble ne pas induire de signalisation sur CXCR4 ni interférer avec celle du SDF-1. L'IC₅₀ antivirale du L5H dans cette étude est de 4 µM.

Nous avons choisi de poursuivre l'investigation du peptide L5H afin d'augmenter le pouvoir antiviral de la molécule. Nous avons réalisé une série de dérivés peptidiques à partir du L5H. Les dérivés peptidiques consistent en des réductions et/ou des substitutions de résidus.

Nous avons obtenu pour le L5H un IC₅₀ antivirale de 70 µM. Nous avons obtenu pour les dérivés du L5H, quant à eux, des IC₅₀ de l'ordre de la centaine de micromolaire.

La différence d'activité antivirale du peptide L5H entre notre propre étude et celle de Heveker & al. peut être imputable à la divergence des systèmes expérimentaux utilisés. Les types cellulaires et les souches virales utilisés dans l'étude de Heveker & al. sont respectivement des cellules Hela P4.2 et la souche virale HIV-1 NDK. Nous avons utilisé des cellules Hela P4 et la souche virale HIV_{89.6}.

L'hypothèse permettant d'expliquer l'activité antivirale du SDF-1 serait celle d'une compétition avec la gp120 pour la liaison à CXCR4 ainsi que la capacité d'induire l'internalisation du récepteur [108].

L'hypothèse favorisée pour expliquer le mécanisme antiviral du L5H (ou de ses dérivés) est celle dans laquelle le peptide et la gp120 se lient simultanément au récepteur et que la stabilisation conformationnelle induite par le peptide bloque le changement conformationnel requis pour l'entrée virale.

6.3 INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CXCR4 PAR LES DÉRIVÉS PEPTIDIQUES DE CXCR4

Dérivés peptidiques de CXCR4 mimant la quatrième portion transmembranaire.

Plusieurs études suggèrent que des peptides mimant des portions transmembranaires d'un RCPG pourraient se lier sélectivement à leur récepteur d'origine et induire des réponses biologiques. L'étude de Hebert & al. a montré qu'un peptide issu d'une portion transmembranaire du récepteur β 2-adrénergique pouvait se lier à ce dernier. Le peptide avait pour effet de rompre les dimères du récepteur β 2-adrénergique [68]. Une autre étude, réalisée par Tarasova & al. a montré que des peptides mimant des portions transmembranaires de CXCR4 présentaient la capacité de protéger de l'infection de cellules CEM-SS infectées par la souche X4 du VIH-1 RF [106]. Enfin, une étude plus récente réalisée par Percherancier et al. a montré qu'un peptide mimant le quatrième segment transmembranaire de CXCR4 pouvait stabiliser l'homodimère de CXCR4 dans une conformation particulière [67].

Nous avons choisi de prolonger l'étude réalisée par Percherancier & al. en testant la capacité de protection antivirale du peptide TM4. Nous avons utilisé deux systèmes cellulaires exprimant respectivement les corécepteurs CXCR4 et CCR5 ainsi que la souche virale X4R5 VIH_{89,6}.

Plusieurs dérivés du TM4 ont été réalisés par raccourcissement peptidique. L'ensemble des dérivés du TM4 ont montré une inhibition de l'infection sur les deux corécepteurs avec peu de sélectivité envers CXCR4. Les IC₅₀ antivirales obtenues pour l'ensemble des dérivés du TM4 sont de l'ordre de la centaine de micromolaire.

Nous avons éprouvé des difficultés de solubilisation des dérivés du TM4 du fait de leur caractère hydrophobe et des précipités ont été observés lors de la solubilisation dans le DMSO.

L'absence de sélectivité des dérivés pour CXCR4 et la formation de précipités en solution nous laisse présumer que leur mécanisme antiviral est dû à une liaison directe à la gp120 plutôt qu'aux corécepteurs.

Dérivés peptidiques de CXCR4 mimant les portions N-terminal et les boucles extracellulaires.

Les données des études de Quiniou & al. ont menés à l'hypothèse que des dérivés peptidiques mimant des portions extracellulaires d'un récepteur pourraient se lier sélectivement à ces derniers et induire des réponses biologiques [129, 130].

Nous avons choisi de tester la capacité de protection antivirale de dérivés peptidiques mimant respectivement les portions N-terminal (N-term) et extracellulaires (ECL) de CXCR4. Les peptides dérivés des portions N-term ou ECL ont montré peu de sélectivité envers CXCR4 ou une absence d'activité antivirale. Le peptide VANWYFGNFLCK issu de la première boucle extracellulaire montre une certaine sélectivité envers CXCR4.

Le mécanisme antiviral du peptide VANWYFGNFLCK pourrait s'expliquer par une liaison sur sa partie correspondante sur le récepteur : la première boucle extracellulaire de CXCR4. Il pourrait influencer sur des structures du récepteur essentielles à la dynamique conformationnelle. Il a ainsi été montré que la deuxième boucle extracellulaire des RCPGs jouait un rôle important dans la transition conformationnelle permettant le passage de l'état inactif à l'état bioactif [131, 132]. Le peptide VANWYFGNFLCK pourrait induire une

stabilisation conformationnelle du récepteur qui bloquerait le changement conformationnel requis pour l'entrée virale.

7 CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de mettre au point des inhibiteurs allostériques de CXCR4 présentant la capacité d'inhiber l'activité coréceptrice d'entrée rétrovirale du récepteur sans interférer avec ses fonctions naturelles.

Les dérivés peptidiques mimant des portions de CXCR4 et de son ligand naturel le SDF-1 ont montré une activité inhibitrice d'entrée rétrovirale (de l'ordre du μM). Les peptides dérivés de CXCR4 ne montrent pas de sélectivité envers le récepteur hormis le peptide VANWYFGNFLCK. L'investigation de ce peptide devra dans l'avenir passer par des étapes de réductions de taille ainsi que des substitutions de résidus afin d'augmenter le pouvoir antivirale de la molécule. Des difficultés techniques relatives au solvant utilisé ne nous ont pas permis d'établir l'effet des peptides sur une des fonctions naturelles de CXCR4, l'induction de la migration cellulaire en réponse au SDF-1. Bien que le projet mettant en jeu ces peptides n'ait pas été poursuivi dans notre laboratoire, il est tout du moins envisageable de continuer l'investigation dans l'avenir. Les peptides dérivés du SDF-1 pourraient notamment servir de base au développement des inhibiteurs de faibles poids moléculaire allostériques répondant aux critères recherchés. Il faudrait également ici continuer les étapes de réductions et de substitutions en résidus du peptide initiale L5H afin d'augmenter le pouvoir antiviral de la molécule.

Les dérivés du T140, puissant inhibiteur de CXCR4 de faible poids moléculaire, représentent l'intérêt majeur de cette étude puisque certains d'entre eux, les dérivés 7 et 14 ont montré un profil allostérique. Ces dérivés présentent en effet la capacité d'inhiber l'entrée rétrovirale via CXCR4 tout en permettant à la chimiokine SDF-1 de se lier au récepteur. Malheureusement, les dérivés 7 et 14 (ainsi que les autres dérivés du T140) ont montré une inhibition d'une fonction naturelle essentielle de CXCR4 : celle d'induire la migration cellulaire. La recherche d'inhibiteurs allostériques de CXCR4 présentant une forte activité antivirale et faible activité anti-chimiotactique demeure activement poursuivie dans notre laboratoire.

Les différences d'activité antivirales et anti-chimiotactiques des dérivés du T140 pourraient s'expliquer par des différences d'affinité pour CXCR4. Les affinités différentes devraient être confirmées par des expériences de liaison au récepteur de compétition homologue en dose réponse. Il serait également utile de vérifier si les inhibiteurs se lient sur des sites identiques ou distincts en réalisant des expériences de liaison au récepteur en présence simultanée de deux inhibiteurs et d'évaluer leur coopérativité de liaison. Il s'agirait dans un second temps de caractériser les résidus de CXCR4 nécessaires à la liaison des différents dérivés par des expériences d'infection mettant en jeu les mutants du récepteur (tel que réalisé pour le T140). Il serait également nécessaire de vérifier la sélectivité de la liaison des dérivés du T140 envers CXCR4 puisqu'il a été montré récemment dans notre laboratoire que le T140 se liait au récepteur CXCR7 en induisant sur ce dernier une signalisation.

Bien que les dérivés allostériques 7 et 14 inhibent la migration cellulaire induite par le SDF-1, il se pourrait que les signalisations du récepteur ne soient pas toutes bloquées. Il s'agirait d'investiguer l'effet de la liaison simultanée d'une part du dérivé 7 avec le SDF-1 et d'autre part du dérivé 14 avec le SDF-1 sur plusieurs tests fonctionnels de signalisation cellulaire.

Il faudrait confirmer l'hypothèse que l'effet antiviral des dérivés du T140 est dû à une stabilisation conformationnelle de CXCR4. L'effet des dérivés du T140 sur la conformation de CXCR4 devra être évalué par test de BRET, comme décrit pour le T140 par Percherancier & al.[67].

Les inhibiteurs allostériques mis au point démontrent nonobstant un intérêt non négligeable puisqu'ils pourraient servir de puissants outils dans la recherche de thérapies anticancéreuses visant le blocage de la diffusion métastatique induite par l'axe CXCR4/SDF-1. Une perspective stimulante serait d'étudier l'effet des dérivés sur des modèles murins de cancer épithéliaux tel que le cancer du sein. Une investigation sur un modèle humain en clinique représenterait un

formidable avancement de recherche. Il serait alors possible d'évaluer l'effet sur la santé humaine des effets inhérents au mécanisme d'action de ce type d'inhibiteur, tel que le relargage des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse dans la circulation. Dans le cas d'absence d'effet néfaste démontré sur le court terme, on pourrait alors envisager d'utiliser ce type d'inhibiteurs dans la période séparant le diagnostique et l'ablation tumorale ou mammaire chez des patients atteints du cancer du sein par exemple.

8 BIBLIOGRAPHIE

1. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
2. UNAIDS: *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*. In.
3. Tersmette, M., et al., *Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2118-25.
4. Penn, M.L., et al., *CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 663-8.
5. Delobel, P., et al., *Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10229-36.
6. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
7. *Évolution de la charge virale et du système immunitaire*. Available from: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Hiv-timecourse-Fr.png>.
8. Graham, D.R., et al., *Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8237-48.
9. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. Embo J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
10. Brugger, B., et al., *The HIV lipidome: a raft with an unusual composition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2641-6.
11. *What are lentiviral vectors?* Available from: <http://biology.kenyon.edu/slouc/gene-web/Lentiviral/Lentivi2.html>.
12. Sattentau, Q.J. and J.P. Moore, *Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding*. J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 407-15.
13. Thali, M., et al., *Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 3978-88.
14. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
15. Wyatt, R., et al., *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 705-11.
16. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
17. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1149-58.

18. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
19. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
20. Shaheen, F. and R.G. Collman, *Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(1): p. 7-16.
21. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
22. **Field's Virology Fifth Edition.**
23. Weiss, R.A., *HIV and AIDS in relation to other pandemics. Among the viruses plaguing humans, HIV is a recent acquisition. Its outstanding success as an infection poses immense scientific challenges to human health and raises the question "What comes next?"* EMBO Rep, 2003. **4 Spec No**: p. S10-4.
24. Egger, M., et al., *Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 119-29.
25. Hogg, R.S., et al., *Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy*. Jama, 2001. **286**(20): p. 2568-77.
26. Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 853-60.
27. Porter, K., et al., *Determinants of survival following HIV-1 seroconversion after the introduction of HAART*. Lancet, 2003. **362**(9392): p. 1267-74.
28. Parker, W.B., et al., *Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human DNA polymerases alpha, beta, and gamma by the 5'-triphosphates of carbovir, 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxyguanosine and 3'-deoxythymidine. A novel RNA template for the evaluation of antiretroviral drugs*. J Biol Chem, 1991. **266**(3): p. 1754-62.
29. Spence, R.A., et al., *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors*. Science, 1995. **267**(5200): p. 988-93.
30. Esnouf, R., et al., *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(4): p. 303-8.
31. Flexner, C., *HIV-protease inhibitors*. N Engl J Med, 1998. **338**(18): p. 1281-92.
32. Patick, A.K. and K.E. Potts, *Protease inhibitors as antiviral agents*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4): p. 614-27.
33. Al-Mawsawi, L.Q., R.I. Al-Safi, and N. Neamati, *Anti-infectives: clinical progress of HIV-1 integrase inhibitors*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(2): p. 213-25.

34. Hazuda, D.J., M. Iwamoto, and L. Wenning, *Emerging Pharmacology: Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Integration*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008.
35. DeJesus, E., et al., *Antiviral activity, pharmacokinetics, and dose response of the HIV-1 integrase inhibitor GS-9137 (JTK-303) in treatment-naive and treatment-experienced patients*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **43**(1): p. 1-5.
36. Hazuda, D.J., et al., *Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells*. Science, 2000. **287**(5453): p. 646-50.
37. Poli, G.I., *PRO-140 (Progenics)*. IDrugs, 2001. **4**(9): p. 1068-71.
38. Kuritzkes, D.R., et al., *Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1*. J Infect Dis, 2004. **189**(2): p. 286-91.
39. Daar, E.S., et al., *High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6574-8.
40. Shearer, W.T., et al., *Recombinant CD4-IgG2 in human immunodeficiency virus type 1-infected children: phase 1/2 study. The Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 351 Study Team*. J Infect Dis, 2000. **182**(6): p. 1774-9.
41. Gauduin, M.C., et al., *Effective ex vivo neutralization of human immunodeficiency virus type 1 in plasma by recombinant immunoglobulin molecules*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2586-92.
42. Ferrantelli, F., et al., *Potent cross-group neutralization of primary human immunodeficiency virus isolates with monoclonal antibodies--implications for acquired immunodeficiency syndrome vaccine*. J Infect Dis, 2004. **189**(1): p. 71-4.
43. Guo, Q., et al., *Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10528-36.
44. Lin, P.F., et al., *A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 11013-8.
45. LaBranche, C.C., et al., *HIV fusion and its inhibition*. Antiviral Res, 2001. **50**(2): p. 95-115.
46. Lalezari, J.P., et al., *Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America*. N Engl J Med, 2003. **348**(22): p. 2175-85.
47. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
48. Janvier, S. and N.M.S.P. Heveker, *[Mystery upon the origin for the selection of AIDS-protective CCR5Delta32]*. N. Med Sci (Paris), 2005. **21**(6-7): p. 577-9.

49. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
50. Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 722-5.
51. Dragic, T., et al., *A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5639-44.
52. De Clercq, E., et al., *Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 668-74.
53. Este, J.A.C.O.I.D., *Sch-351125 and Sch-350634*. Schering-Plough. Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(3): p. 379-83.
54. Strizki, J.M., et al., *SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12718-23.
55. Watson, C., et al., *The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(4): p. 1268-82.
56. Fatkenheuer, G., et al., *Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1170-2.
57. Dorr, P., et al., *Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4721-32.
58. Hatse, S., et al., *Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4*. FEBS Lett, 2002. **527**(1-3): p. 255-62.
59. De Clercq, E., *Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 833-9.
60. Fricker, S.P., et al., *Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(5): p. 588-96.
61. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-33.
62. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
63. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1369-75.

64. Zaitseva, M.B., et al., *CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3103-13.
65. Liang, X.C.B.D.D., *CXCR4, inhibitors and mechanisms of action*. Chem Biol Drug Des, 2008. **72**(2): p. 97-110.
66. He, J., et al., *CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 645-9.
67. Percherancier, Y., et al., *Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9895-903.
68. Hebert, T.E., et al., *A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16384-92.
69. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
70. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 591-4.
71. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
72. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1199-211.
73. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
74. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
75. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
76. Huang, X., et al., *Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor*. Biophys J, 2003. **84**(1): p. 171-84.
77. Rochdi, M.D. and J.L. Parent, *Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17827-37.
78. Ganju, R.K., et al., *The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23169-75.
79. Nishita, M., H. Aizawa, and K. Mizuno, *Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 774-83.

80. Vicente-Manzanares, M., et al., *A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis.* J Immunol, 2002. **168**(1): p. 400-10.
81. Haribabu, B., et al., *Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization.* J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28726-31.
82. Pohlmann, S., F. Baribaud, and R.W. Doms, *DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV.* Trends Immunol, 2001. **22**(12): p. 643-6.
83. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells.* Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
84. Arthos, J., et al., *HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 301-9.
85. McDougal, J.S., et al., *Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule.* Science, 1986. **231**(4736): p. 382-5.
86. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.* Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
87. Klatzmann, D., et al., *Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes.* Science, 1984. **225**(4657): p. 59-63.
88. Maddon, P.J., et al., *The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.* Cell, 1986. **47**(3): p. 333-48.
89. Blanpain, C., et al., *Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity.* J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18902-8.
90. Doms, R.W. and D. Trono, *The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield.* Genes Dev, 2000. **14**(21): p. 2677-88.
91. Alkhatib, G., et al., *HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation.* Virology, 1997. **234**(2): p. 340-8.
92. Atchison, R.E., et al., *Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines.* Science, 1996. **274**(5294): p. 1924-6.
93. Aramori, I., et al., *Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor.* Embo J, 1997. **16**(15): p. 4606-16.
94. Popik, W., J.E. Hesselgesser, and P.M. Pitha, *Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway.* J Virol, 1998. **72**(8): p. 6406-13.

95. Popik, W. and P.M. Pitha, *Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor*. *Virology*, 1998. **252**(1): p. 210-7.
96. Cohen, P.S., et al., *The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication*. *Mol Med*, 1997. **3**(5): p. 339-46.
97. Yang, X. and D. Gabuzda, *Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. *J Virol*, 1999. **73**(4): p. 3460-6.
98. Shapiro, L., et al., *Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(13): p. 7422-6.
99. Kumar, S., et al., *Activation of the HIV-1 long terminal repeat by cytokines and environmental stress requires an active CSBP/p38 MAP kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(48): p. 30864-9.
100. Cicala, C., et al., *Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 420-6.
101. Lee, C., et al., *Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(5): p. 676-82.
102. Roggero, R., et al., *Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling*. *J Virol*, 2001. **75**(16): p. 7637-50.
103. Biard-Piechaczyk, M., et al., *Caspase-dependent apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4 is induced by cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120)*. *Virology*, 2000. **268**(2): p. 329-44.
104. Marinissen, M.J. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. **22**(7): p. 368-76.
105. Sotsios, Y., et al., *The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes*. *J Immunol*, 1999. **163**(11): p. 5954-63.
106. Tarasova, N.I., W.G. Rice, and C.J.J.B.C. Michejda, *Inhibition of G-protein-coupled receptor function by disruption of transmembrane domain interactions*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(49): p. 34911-5.
107. Heveker, N., et al., *Pharmacological properties of peptides derived from stromal cell-derived factor 1: study on human polymorphonuclear cells*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(6): p. 1418-25.
108. Heveker, N., et al., *Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides*. *J. Curr Biol*, 1998. **8**(7): p. 369-76.

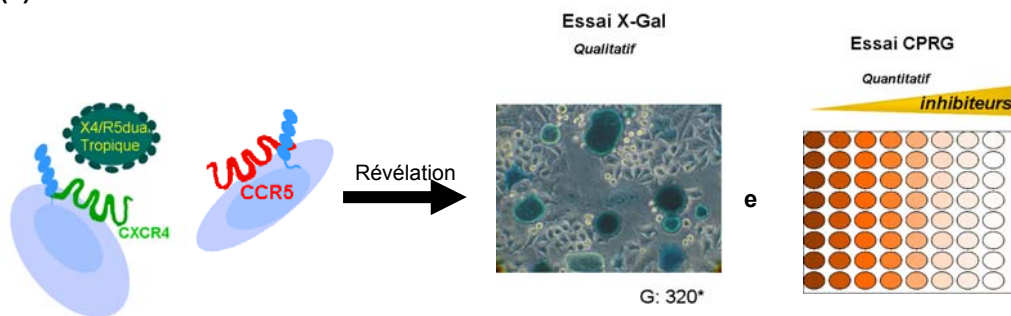
109. Murakami, T., et al., *Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7489-96.
110. Murakami, T., et al., *A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1389-93.
111. Nakashima, H., et al., *Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(6): p. 1249-55.
112. Tamamura, H., et al., *Certification of the critical importance of L-3-(2-naphthyl)alanine at position 3 of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to an exploratory performance of its downsizing study*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(5): p. 1417-26.
113. Tamamura, H., et al., *A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 877-82.
114. Tamamura, H., *[Development of selective antagonists against an HIV second receptor]*. Yakugaku Zasshi, 2001. **121**(11): p. 781-92.
115. Flomenberg, N., et al., *The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1867-74.
116. Liles, W.C., et al., *Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist*. Transfusion, 2005. **45**(3): p. 295-300.
117. Reddy, G.K., J. Crawford, and V.K. Jain, *The Role of Plerixafor (AMD3100) in Mobilizing Hematopoietic Progenitor Cells in Patients with Hematologic Malignancies*. Support Cancer Ther, 2006. **3**(2): p. 73-6.
118. Hatse, S., et al., *AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(5): p. 752-61.
119. Ichiyama, K., et al., *A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4185-90.
120. Vabeno, J., G.V. Nikiforovich, and G.R. Marshall, *A minimalistic 3D pharmacophore model for cyclopentapeptide CXCR4 antagonists*. Biopolymers, 2006. **84**(5): p. 459-71.
121. Tamamura, H., et al., *Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs*. Org Biomol Chem, 2006. **4**(12): p. 2354-7.
122. Kenakin, T.N.R.D.D., *New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(11): p. 919-27.
123. Labrosse, B., et al., *Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6381-8.

124. Kunkel, H.A., A. Trams, and V. Claudius, [*The mutagenic effect of n-nitroso-n-methyl acetamide in Drosophila melanogaster*]. *Biophysik*, 1967. **4**(1): p. 90-1.
125. Duarte, A.M., C.P. van Mierlo, and M.A. Hemminga, *Molecular dynamics study of the solvation of an alpha-helical transmembrane peptide by DMSO*. *J Phys Chem B*, 2008. **112**(29): p. 8664-71.
126. Brelot, A., et al., *Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(31): p. 23736-44.
127. Xu, Y., et al., *Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. **15**(5): p. 419-27.
128. Trent, J.O., et al., *Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 47136-44.
129. Quiniou, C., et al., *Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor*. *J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 6977-87.
130. Quiniou, C., et al., *Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor*. *Semin Perinatol*, 2008. **32**(5): p. 325-33.
131. Massotte, D. and B.L. Kieffer, *The second extracellular loop: a damper for G protein-coupled receptors?* *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(4): p. 287-8.
132. Klco, J.M., et al., *Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(4): p. 320-6.

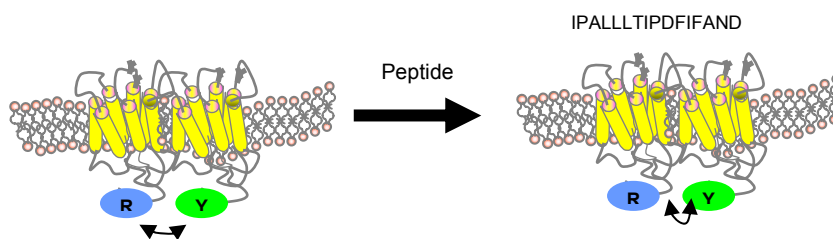
9 ANNEXE

Méthodes

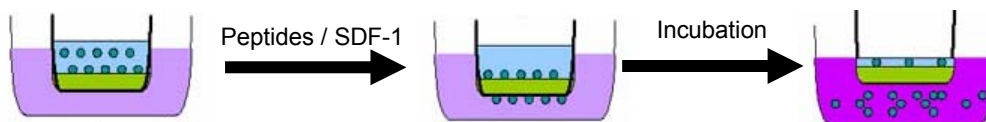
(a) Essai d'infektivité



(b) Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET)



(c) Essai de chimiotactisme



Représentation schématique des trois techniques utilisées.

a) Essai d'infection b) Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence BRET c) Essai de chimiotactisme.