

CHAPTER VI

RÉSUMÉ

Le but ultime du traitement des infections par le VIH est d'améliorer la santé des «patients» et de prolonger leur vie. Le principal objectif de la thérapie antirétrovirale est de ralentir - ou, idéalement, d'arrêter la réplication du VIH puis de permettre le rétablissement du système immunitaire. Le traitement conventionnel des patients infectés est actuellement un protocole de traitement antirétroviral hautement actif (ou HAART). Ces schémas peuvent considérablement réduire la réplication du VIH en interférant avec la cascade de la réplication virale et ainsi prolonger la vie des individus infectés par le VIH. Toutefois, la multithérapie exige un traitement à vie avec pour conséquence une toxicité cumulative, certains médicaments interfèrent avec le fonctionnement normal des cellules humaines, provoquant une variété d'effets secondaires. En outre, le VIH développe généralement des mutations qui le rendent résistant aux médicaments. Par ailleurs son ADN persiste intégré dans le génome des cellules infectées et forme ainsi des réservoirs cellulaires, causes d'infections latentes.

En s'intéressant aux inhibiteurs de l'assemblage et la maturation, de nouveaux inhibiteurs de la maturation, bloquant le processus Gag et l'assemblage de CA, ont été récemment identifiés. PA-547 inhibe le processus Gag à la jonction CA-SP1 et se lie directement à ce site. Cependant, il semble que ce médicament ne bloque pas complètement, mais simplement retarde, la protéolyse de la jonction CA-SP1. La

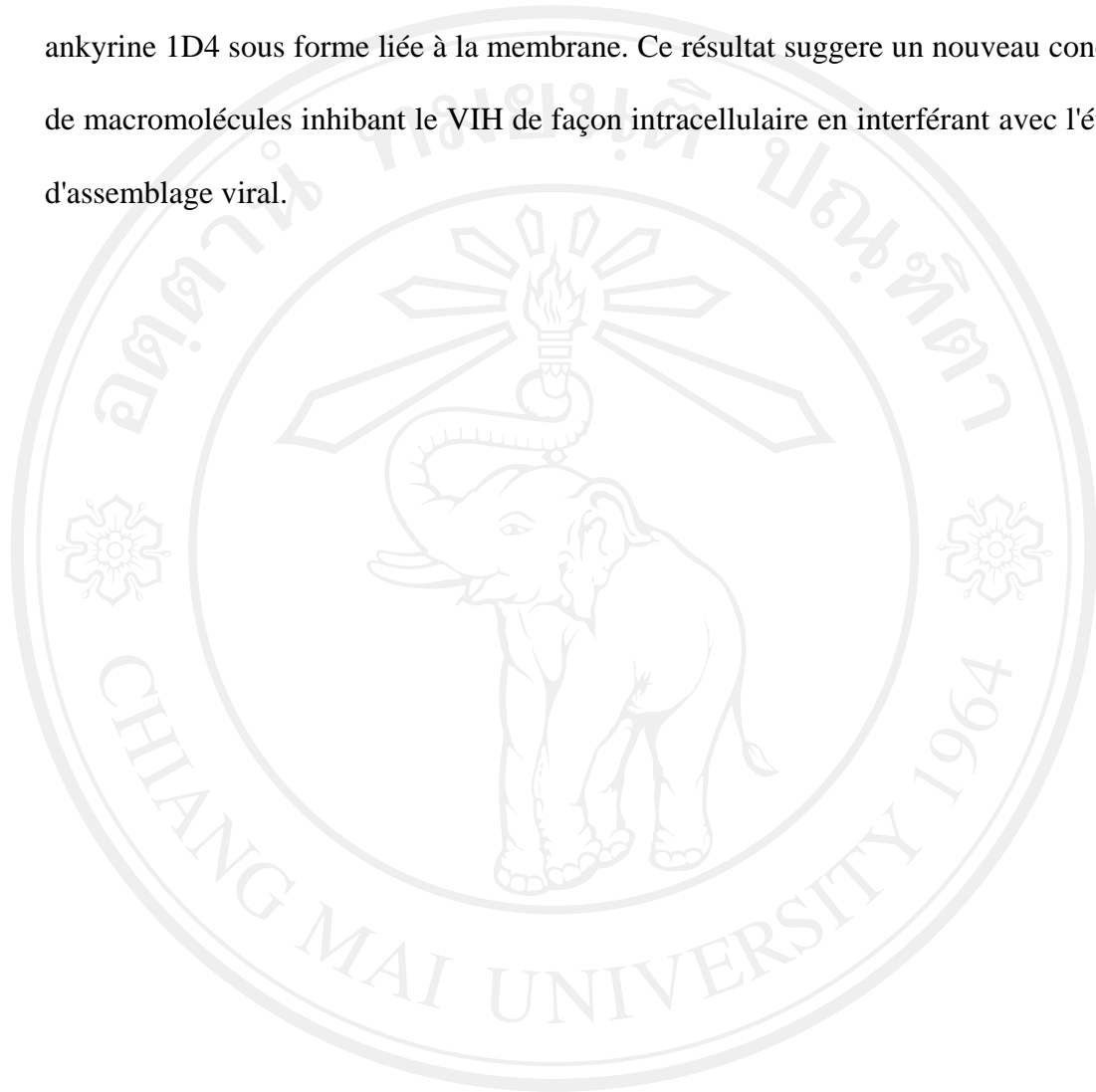
seconde classe des inhibiteurs tels que le composé methylphenylurea (PAC-1) et un peptide de 12 résidus (CA-I) qui se lie au sein de l'interface matures CANTD-CACTD, ce qui suggère que l'assemblage de la capsid peut être inhibé en perturbant l'interaction du domaine CA. Bien que l'AC-I et de la PAC-1 se lient trop faiblement pour devenir cliniquement utile, la découverte de ces deux inhibiteurs fait de ce site une cible intéressante pour le développement d'autres inhibiteurs. Compte tenu de l'accroissement des connaissances des mécanismes qui permettent le contrôle de l'infection au VIH, plusieurs chercheurs se concentrent sur la thérapie génique, comme une approche autonome ou comme adjuvant aux régimes pharmacologiques. La thérapie génique vise à empêcher la progression de l'infection par le VIH en interférant avec la réplication virale soutenue éventuellement même en l'absence de chimiothérapie chronique.

Cette étude vise à découvrir de nouveaux agents actifs comme inhibiteurs de la réplication du VIH reposant sur des protéines intracellulaires. Des protéines à motif répété ankyrine présentent des propriétés potentiellement plus favorables que les anticorps pour interagir de façon intracellulaire. Cette ossature moléculaire a été retenue pour générer une bibliothèque de protéines artificielles à partir de laquelle il sera possible de sélectionner des molécules se liant spécifiquement à la matrice du VIH (MA) et aux protéines de capsid (CA). La molécule cible exprimée en protéine de fusion à une étiquette hexa-Histidine (H₆MA-CA) a été produite en cellules d'insectes en utilisant le système d'expression baculovirus. La bibliothèque artificielle d'ankyrine artificielle a été construite de façon à mimer les propriétés communes aux protéines ankyrines naturelles. Les acides aminés localisés aux positions hypervariables ont été codés de façon partiellement aléatoire mais de sorte à ce que

leur distribution tend vers la distribution observée à l'état naturel. Les résidus invariables sont pour l'essentiel identiques à un consensus préalablement décrit avec quelques modifications nécessaires pour créer en certaines positions un site de reconnaissance pour des enzymes de restriction indispensable au procédé de construction de la bibliothèque. Plusieurs clones capables d'interagir spécifiquement à H₆MA-CA ont été efficacement isolés à partir de cette bibliothèque par la technologie de phage display. En outre, un certain nombre de molécules interagissant spécifiquement avec une autre protéine cible (A3 est une protéine composée de répétition de motifs hélicoïdaux) ont été isolés en parallèle pour évaluer l'efficacité de cette bibliothèque construite. Les fragments d'ADN codant ces protéines spécifiques ont ensuite été transférés dans un vecteur d'expression cytoplasmique ce qui a permis d'obtenir une expression très efficace sous forme de protéines solubles. L'efficacité de liaison des candidats isolés a été analysée par différentes techniques. En outre, des anticorps monoclonaux contre H₆MA-CA ont été générés en parallèle. Tous les clones ankyrine choisis, 1D4, 1B8, 6B4 se lient spécifiquement aux molécules cibles avec un degré d'activité distinct comme le montre le test ELISA. Les expériences de western blot suggèrent que le site spécifique de ces ligands ankyrine était situé sur le domaine CA. En outre, ce domaine n'est pas superposé à l'épitope des anticorps monoclonaux contre le domaine CA. Le meilleur candidat ankyrine (1D4) a été choisi afin de mieux évaluer son affinité pour la cible. Mesurée en calorimétrie de titration isotherme (ITC), 1D4 présente une constante de dissociation d'environ 0,45 μ M.

Afin d'examiner l'activité de 1D4 *in vivo*, deux vecteurs individuels ont été construits pour obtenir des lignées stables de cellules exprimant le virus VIH (Sup-T1) ainsi que la protéine 1D4 soit sous forme liée à la membrane soit sous forme

cytoplasmique. Les données préliminaires de l'effet sur l'assemblage viral montrent une remarquable diminution de p24 (CA) au niveau des cellules exprimant la protéine ankyrine 1D4 sous forme liée à la membrane. Ce résultat suggère un nouveau concept de macromolécules inhibant le VIH de façon intracellulaire en interférant avec l'étape d'assemblage viral.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved