

Mise au point

## Les progrès récents dans la connaissance de la structure de la transcriptase inverse du virus d'immunodéficience humaine suggèrent-ils la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme et de nouvelles drogues anti sida ?

Georges Maury<sup>1</sup>, Gilles Divita<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département de chimie organique fine, URA 488, Université Montpellier II,  
Sciences et techniques du Languedoc, place E Bataillon, 34095 Montpellier 5, France

<sup>2</sup> Abteilung Biophysik, Max-Planck Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Allemagne

(reçu le 8 mars 1995, accepté le 21 septembre 1995)

**Summary** – This short review is intended for synthetic organic or bioorganic chemists who are interested in new strategies in the design of inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase (RT) as anti-AIDS drugs. Following the presentation of RT and its already known inhibitors, recent advances in the knowledge of the structure and the mechanism of this key viral enzyme in its heterodimeric form are described. In the last part of the review, new methods in the design of enzyme inhibitors directly inspired from the recently disclosed structure of RT are presented, *eg*, bi-ligand inhibitors, or inhibitors of heterodimer formation.

**HIV/ reverse transcriptase / structure / inhibitor design**

### Introduction

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (sida). C'est un rétrovirus de la famille des lentivirus dont l'information génétique est encodée dans un ARN monobrin (acide ribonucléique) qui est introduit dans la cellule hôte (lymphocytes T) durant l'infection. Pour sa reproduction (réplication), le virus utilise la «machinerie» biochimique cellulaire mais aussi, dans les premières étapes du cycle, des enzymes virales introduites dans la cellule lors de l'infection. La protéine virale essentielle, nécessaire au début du cycle de reproduction du virus, s'appelle la *transcriptase inverse* (RT\*) car elle catalyse la transformation du polymère d'ARN viral en polymère d'ADN (acide désoxyribonucléique) complémentaire qui sera ensuite intégré dans l'ADN de la cellule hôte afin de maintenir l'état persistant de l'infection. Cette transformation est de nature inverse à celle observée le plus souvent, c'est à dire la transformation de l'ADN en ARN messager (trans-

cription). La complémentarité entre ARN viral et ADN viral dont il est question ici est naturellement celle existant entre les hétérocycles (bases) des nucléotides composant les polymères ARN ou ADN, c'est à dire entre l'adénosine et la thymidine (ou l'uridine) (A–T ou A–U) et entre la guanosine et la cytidine (G–C).

Son origine virale et sa localisation dans le cytoplasme de la cellule hôte différencient à priori la RT des ADN polymérases cellulaires des animaux supérieurs. Elle constitue donc une cible de choix en thérapie anti sida : on peut en effet espérer que les inhibiteurs de l'enzyme virale ne soient pas actifs sur les polymérases cellulaires nécessaires aux cellules.

Avant 1992, la conception des inhibiteurs potentiels de la RT tenait compte uniquement des types de réactions catalysées par l'enzyme. Ainsi, des analogues de nucléosides sans groupement OH en position 3' (fig 1) induisent un avortement de la synthèse de l'ADN viral s'ils sont intégrés dans le polymère. Des tests d'évaluation *in vitro* mettant en œuvre des cellules infectées sont ensuite nécessaires pour choisir les meilleurs composés du point de vue de l'inhibition du VIH et de la toxicité cellulaire. De nombreux analogues ont été ainsi étudiés, en particulier ceux qui sont actuellement officiellement approuvés : AZT, ddI, ddC, d<sub>4</sub>T (fig 1 et 3). Malheureusement, les résultats des évaluations, s'ils sont négatifs, ne donnent pas beaucoup d'indications sur la manière

\* Le sigle RT accepté internationalement désigne ici la transcriptase inverse du virus d'immunodéficience humaine numéro 1 (VIH-1) : il est constitué des initiales du nom anglais «reverse transcriptase».

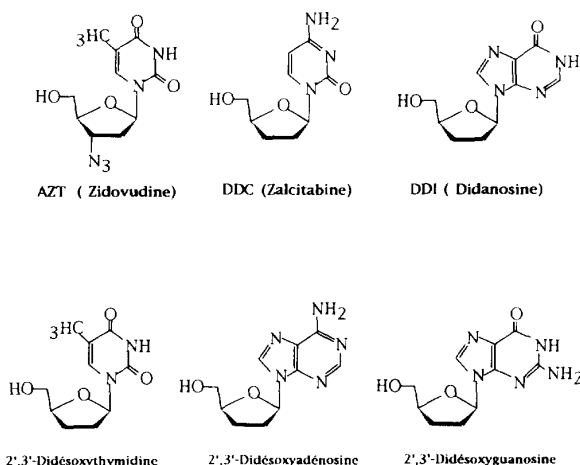


Fig 1

de modifier les structures des analogues de nucléosides dans le but de rendre l'inhibition plus efficace. Cette approche est donc par essence aléatoire.

La détermination très récente (par diffraction aux rayons X) de la structure tridimensionnelle de la transcriptase inverse du VIH-1 complexée avec divers ligands (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Jacobo-Molina *et al.*, 1993; cf Ref 13 et 15) ouvre, de l'avis de tous les spécialistes, de nouvelles perspectives notamment en ce qui concerne la connaissance des sites actifs de l'enzyme et des points de contact entre la protéine et ses ligands. L'objet de cette mise au point est de présenter de manière très concise l'état des connaissances actuelles sur la RT ainsi que les différentes stratégies d'inhibition existantes ou prévisibles d'après les récentes évolutions dans la connaissance de sa structure tridimensionnelle.

### Réactions catalysées par la RT dans la reproduction du virus

Dans la transformation de l'ARN viral monobrin (un seul polymère) en un duplex d'ADN (deux brins complémentaires appariés) intégrable dans l'ADN cellulaire, la RT catalyse trois réactions essentielles selon un mécanisme ordonné (fig 2) [1].

Il s'agit d'abord de la synthèse d'un ADN (appelé (-)ADN) complémentaire de l'ARN viral. Le processus catalytique exige la présence de quatre substrats (les 5'-triphosphates des quatre 2'-désoxynucléosides naturels) et d'un oligonucléotide amorce, qui se complexe à l'ARN servant de matrice. Dans le complexe d'initiation de la synthèse du polymère (-)ADN, cette amorce est constituée par une partie d'un ARN de transfert cellulaire (tRNA<sup>lys</sup>). La réaction chimique catalysée est une attaque nucléophile par le groupement 3'-OH à l'extrémité de l'amorce vers le phosphore α du groupement 5'-triphosphate des substrats. Le résultat de cette substitution avec inversion de la configuration de Po est la formation de la liaison 3'O-Pα-5'O et l'expulsion d'un ion pyrophosphate (fig 2). Ce processus effectué, la catalyse se poursuit par l'incorporation du nucléotide

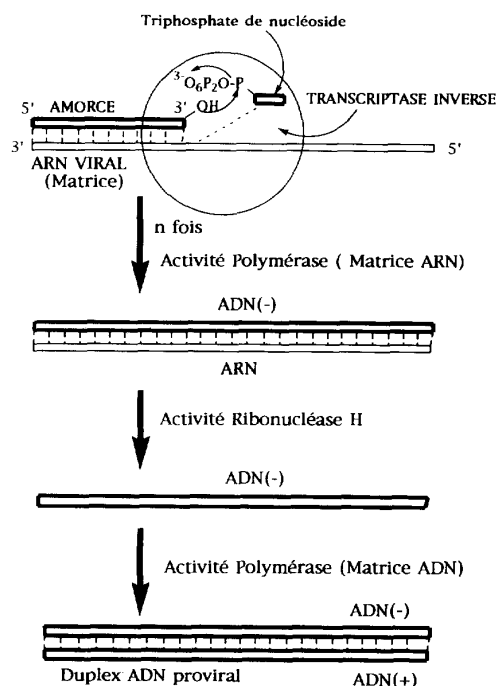


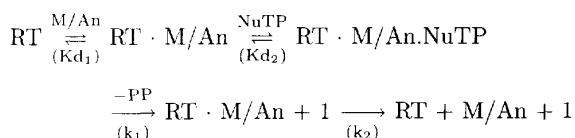
Fig 2

complémentaire du prochain nucléotide libre sur la matrice, etc... Il s'agit de l'activité *ADN polymérase ARN dépendante* de la RT.

La deuxième réaction catalysée par la RT est l'hydrolyse en oligonucléotides courts de la partie de la matrice (ARN viral) complexée (hybridée) avec le polymère (-)ADN : il s'agit de l'activité *ribonucléase H* (pour hybride) de la RT. Après cette hydrolyse, un oligonucléotide court reste apparié au (-)ADN et sert d'amorce à la synthèse ultérieure d'un ADN complémentaire.

La troisième réaction catalysée est la synthèse du polymère (+)ADN complémentaire du (-)ADN : le duplex proviral (-)ADN/(+)ADN sera ensuite intégré dans les chromosomes de la cellule hôte. Cette étape de synthèse de l'ADN correspond à l'activité *ADN polymérase ADN dépendante* de la RT.

Cette présentation très simplifiée ne doit pas occulter le fait que l'ensemble du processus est très complexe. De nombreuses études cinétiques ou à l'équilibre ont été réalisées en utilisant par exemple la radioactivité ou la fluorescence. Pour donner une idée de la complexité de la réaction, un mécanisme simplifié d'un seul cycle d'incorporation est donné dans le schéma ci-dessous [2] :



M/An : Duplex Matrice/Amorce à n nucléotides,

NuTP : 5-Triphosphate d'un désoxynucléoside ou d'un analogue,

Kd<sub>1</sub> : Constante de dissociation du complexe RT et M/An,

Kd<sub>2</sub> : Constante de dissociation du complexe binaire précédent et NuTP,

- $k_1$  : Constante de vitesse d'incorporation du (n+1)ième nucléotide à l'extrémité 3' de l'amorce,  
 $k_2$  : Constante de vitesse de dissociation du complexe libérant RT.

Ce schéma réactionnel comporte trois étapes majeures. La fixation du duplex matrice/amorce sur la RT est suivie de la fixation du nucléotide complémentaire du premier nucléotide libre de la matrice formant un complexe ternaire actif RT · matrice/amorce · dNuTP. La troisième étape est la réaction chimique d'incorporation qui est suivie soit d'un nouveau cycle de polymérisation, soit de la libération du duplex matrice/amorce prolongée. Dans le cas où le (n+1)ième nucléoside incorporé ne possède pas de groupement 3'-OH (terminateur de chaîne), la prolongation de l'amorce est stoppée mais le complexe RT · M/A<sub>n+1</sub> peut être aussi très stable et l'enzyme n'être libérée qu'avec difficulté [3].

D'autre part, des études cinétiques par spectroscopie de fluorescence ont montré récemment que les deux premières étapes du mécanisme définies ci-dessus correspondent, en réalité, chacune à deux étapes : une association de type bimoléculaire enzyme-substrats suivie d'un changement de conformation du complexe formé. Dans tous les cas, ces changements conformationnels constituent les facteurs limitant du mécanisme [4, 5]. Chacun des événements intervenant dans ce mécanisme constitue une cible potentielle d'inhibition de la RT.

### Types d'inhibiteurs actuels de la transcriptase inverse

Bien avant que la structure tridimensionnelle de la RT ne soit connue, de nombreuses études de mise au point d'inhibiteurs de cette enzyme ont été réalisées. Trois principaux types d'inhibiteurs peuvent être cités : (i) les analogues de nucléosides terminateurs de chaînes déjà évoqués, (ii) les inhibiteurs non nucléosidiques, (iii) des oligonucléotides ou leurs analogues pouvant agir comme agents antisens ou directement comme ligands de l'enzyme :

#### Les 2',3'-didésoxynucléosides terminateurs de chaîne ou leurs analogues

Une étude systématique a été engagée. Ces composés portent des modifications structurales sur le sucre et/ou la base. Dans des conditions particulières, les études cinétiques montrent qu'il s'agit d'inhibiteurs compétitifs par rapport à des substrats naturels, ce qui implique que les dérivés 5'-triphosphates correspondants se fixent à la RT dans le même site actif que ces substrats naturels. D'autre part, ces composés sont actifs (ou supposés actifs) contre les deux types de virus : VIH-1 et VIH-2. Il doit être noté que seuls les analogues de nucléosides et non leurs métabolites 5'-phosphorylés peuvent être éventuellement utilisés comme drogues : en effet, les triphosphates sont trop polaires pour traverser la membrane cellulaire ou sont déphosphorylés avant de l'atteindre. Les analogues nucléosidiques doivent donc être phosphorylés jusqu'au stade du 5'-triphosphate par des kinases dans l'organisme.

Les composés les plus importants de cette catégorie sont présentés dans des mises au point récentes [6, 7].

A côté des AZT, ddl et ddC déjà évoqués (fig 1), citons les analogues fluorés comme la 3'-fluoro-2',3'-didésoxythymidine (FLT) (1) (fig 3), les dérivés 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxynucléosides comme la d<sub>4</sub>T (2) ou la d<sub>4</sub>C (3), les nucléosides carbocycliques dont le plus important est le carbovir 4 (fig 3), les dérivés 3'-oxa ou 3'-thia nucléosides comme le dioxolane T (5) ou la 2',3'-didésoxy-3'-thiacytidine (6) (fig 3). La famille des phosphonates acycliques analogues de 5'-monophosphates de nucléosides comme la 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine (PMEA, 7) (fig 3) est également notable. Un problème crucial dans l'utilisation de tels inhibiteurs est l'apparition rapide de souches de virus résistantes. Cette résistance aux inhibiteurs est due à des mutations ponctuelles de la RT, c'est-à-dire des remplacements de certains chaînons d' $\alpha$ -aminoacides de la protéine par d'autres entraînant des modifications de la structure et des propriétés de l'enzyme [8]. Après mutation, la RT présente une très faible affinité pour la molécule d'inhibiteur, entraînant ainsi le phénomène de résistance.

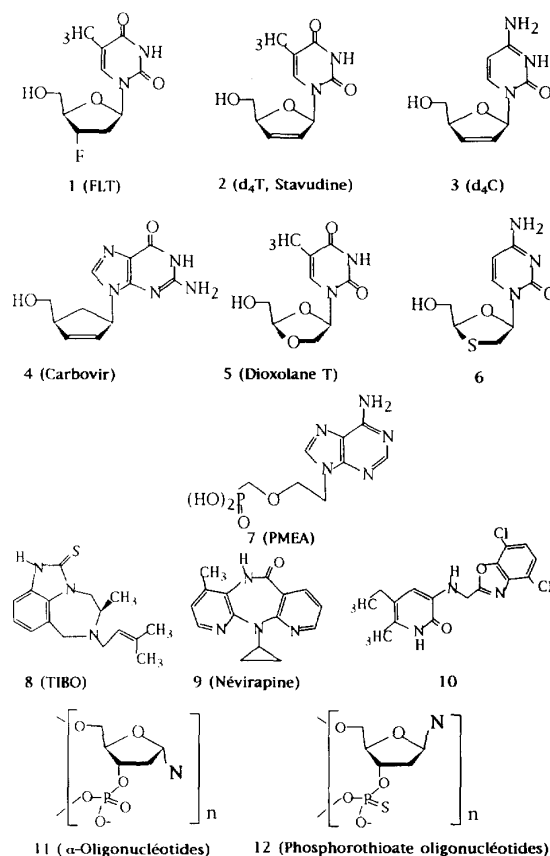


Fig 3

#### Inhibiteurs non nucléosidiques de la RT (INNRT)

Contrairement aux précédents, ces inhibiteurs ont été découverts à la suite de «screenings» largement aléatoires, sans idées préconçues quant à leurs structures et sans autre exigence que l'absence de toxicité sur les

cultures cellulaires. Il s'agit de molécules appartenant à diverses séries en général hétérocycliques qui se comportent comme inhibiteurs non compétitifs de la RT en présence de certains substrats naturels. Cela suggère que l'interaction avec la RT s'effectue au niveau d'un ou plusieurs sites différents du site de complexation des nucléosides triphosphate. Dans d'autres conditions, l'inhibition peut être compétitive, ce qui s'interprète par une possibilité de «couplage» du site actif avec ces sites secondaires. La plupart des INNRT sont spécifiques de la RT de HIV-1 et sans action sur celle de HIV-2 ou sur les ADN polymérases cellulaires nécessaires à la vie de la cellule. Cette spécificité est liée à la présence de deux résidus tyrosine en position 181 et 188 dans la séquence des  $\alpha$ -aminoacides de la RT qui sont indispensables pour la fixation de ces inhibiteurs sur l'enzyme. L'étude détaillée des INNRT a montré qu'ils interviennent au niveau des changements de conformation des complexes RT · matrice/amorce · dNuTP et inhibent fortement l'étape chimique du mécanisme, c'est-à-dire la formation de la liaison entre le groupe 3'-OH terminal de l'amorce et P $\alpha$  de dNuTP [5, 8].

Les inhibiteurs les plus importants de cette série qui se développe rapidement [6] sont des imidazobenzodiazépines (TIBO), **8** (fig 3), des dipyridobenzodiazépines (Névirapine), **9** (fig 3), des acyclouridines substituées, des phénylthiothymines (HEPT), des benzoxazolylypyridines (*cf* **10**) (fig 3) et des  $\alpha$ -anilino phénylacétamides [9]. Toutefois, les phénomènes de résistance par mutations de la RT sont importants vis-à-vis des INNRT (aussi bien que des inhibiteurs analogues nucléosidiques) et limitent malheureusement leur utilisation [8].

#### *Inhibiteurs oligonucléotidiques analogues d'amorce ou leurs duplex*

Les oligonucléotides peuvent inhiber les réactions catalysées par la RT de plusieurs façons. Si la séquence des bases est complémentaire d'une partie de la séquence des bases de l'ARN viral, la complexation de l'oligonucléotide à l'ARN empêchera la formation complète de l'ADN(-) complémentaire (stratégie de type «antisens») (*cf* fig 2). Ainsi, un analogue phosphorothioate oligonucléotide ciblé contre une partie du gène gag du VIH-1 [10] est actuellement en cours d'essais cliniques. Les oligonucléotides peuvent aussi interagir directement avec la RT soit sous forme libre, soit sous forme de complexe avec la matrice (analogues de duplex matrice/amorce). Dans les deux derniers cas, on observe des inhibitions compétitives de la RT, ce qui suggère que l'oligonucléotide inhibiteur ou son duplex se complexe dans le site actif de la RT correspondant au duplex matrice/amorce. Cette seconde stratégie d'inhibition de la RT par des oligonucléotides ne peut être efficace qu'à la condition que l'oligonucléotide inhibiteur puisse pénétrer dans la cellule et qu'il soit résistant aux enzymes catalysant sa dégradation par hydrolyse (nucléases). Ceci explique que les études d'inhibition de ce type mettent en œuvre des analogues oligonucléotidiques comme les  $\alpha$ -oligonucléotides **11** (fig 3) ou les phosphorothioates

oligonucléotides **12** (fig 3) [11] dont on connaît la stabilité en présence des enzymes de dégradation. L'utilisation de ces analogues d'amorce semble cependant limitée par la toxicité présentée par certains oligomères.

#### **Structure de la transcriptase inverse du VIH-1**

La forme biologiquement active de la transcriptase inverse du VIH est un dimère composé de 2 sous unités nommées p66 et p51, de masses moléculaires respectives 66 kDa et 51 kDa. Ces deux polypeptides sont issus du même gène, et p51 résulte d'un clivage enzymatique (protéolyse) de p66 au niveau du domaine C-terminal portant l'activité RNase-H. Les différentes activités catalytiques (polymérase ou RNase-H) sont présentes exclusivement dans les formes dimères p66/p51 ainsi que p66/p66. Le dimère p51/p51 présente seulement une faible activité polymérase et les formes homodimères sont beaucoup moins stables que p66/p51 [12].

Dans les deux ou trois dernières années, plusieurs structures tridimensionnelles à haute résolution (2,9 à 3,5 Å) de la RT du VIH-1 ont été déterminées par diffraction de rayons X. Le groupe de T Steitz a résolu la structure cristallographique de la RT complexée avec l'INNRT névirapine (fig 3) [13, 14]. E Arnold et ses collaborateurs ont, quant à eux, publié la structure du complexe ternaire de la RT du VIH-1 avec un fragment d'anticorps monoclonal Fab et un duplex ADN/ADN de 19 et 18 bases [15].

Les domaines catalytiques de polymérisation des deux structures sont similaires et rappellent celui déjà connu d'un fragment de l'ADN polymérase I de *E coli* (fragment de Klenow). D'autre part, cette ressemblance structurale globale de la molécule se retrouve dans les structures de deux autres polymérases publiées encore plus récemment : l'ADN polymérase  $\beta$  du rat [16] et la RNA polymérase du bactériophage T7 [17], bien que les séquences en  $\alpha$ -aminoacides soient très différentes. La sous unité p66 porte la partie catalytique de la RT avec en particulier les sites actifs d'élongation de l'amorce et d'activité RNase-H. Cette sous-unité forme une cavité très étendue dans laquelle se complexe le duplex matrice/amorce. L'organisation générale des éléments de structure secondaire du polypeptide p66 (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , etc...) est agencée de telle sorte que la forme globale présente une ressemblance anatomique approximative avec celle d'une main droite à demi ouverte [13] (fig 4). Cette analogie permet de diviser p66 en plusieurs domaines : le domaine correspondant à l'activité polymérase, comportant les «doigts», la «paume», le «pouce», le domaine de connexion constituant l'interface entre le domaine de polymérisation et le domaine renfermant l'activité RNase H. Le site actif complexant les nucléosides-5'-triphosphates ou leurs analogues s'étend entre la paume, la base des doigts et le pouce. Le sous-domaine correspondant au pouce joue un rôle essentiel dans le placement du duplex matrice/amorce dans le site catalytique ainsi que dans son mouvement au cours de la catalyse. Par exemple, lors de la fixation d'un duplex ADN/ADN, le pouce effectue une rotation d'environ 30° [1]. Le site de complexation de la névirapine et des autres INNRT est localisé sur

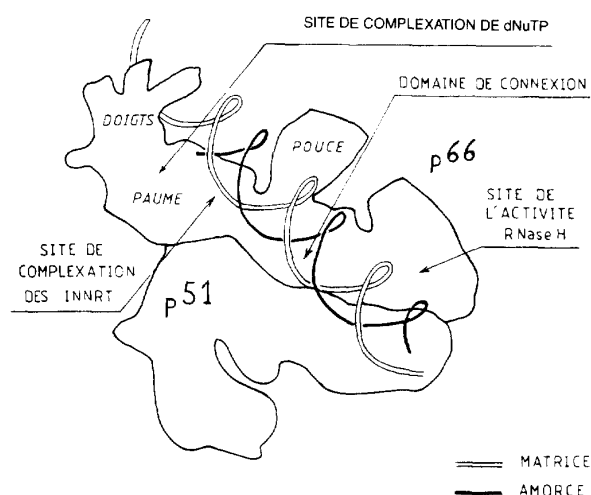


Fig 4

la paume, entre le pouce et la base des doigts, relativement près du site catalytique d'extension de l'amorce [18]. Le pouvoir inhibiteur des INNRT serait ainsi dû au blocage du mouvement du pouce [13a] ou un blocage de l'ensemble du site actif de polymérisation [18], après complexation de l'INNRT dans son site. Finalement, l'ensemble de p66 et une partie de p51 contribuent à la complexation du duplex matrice/amorce et son blocage en position orientée de manière optimale par rapport au site actif complexant dNuTP [19]. Bien que possédant la même organisation de structure secondaire, l'agencement des différents domaines de la sous-unité p51 dans le dimère est radicalement différent de celui de p66. En particulier, la cavité très étendue complexant le duplex à la surface de p66 est entièrement fermée dans p51, le domaine de connexion (qui est la zone principale d'interaction entre les deux sous-unités) ayant pivoté à l'intérieur de la paume. La sous-unité p51 ne possède pas d'activité catalytique : il semble qu'elle maintienne la stabilité structurale du dimère en formant un socle supportant le site de fixation du duplex matrice/amorce [13, 15]. Enfin, une très récente détermination de la structure de l'enzyme non complexée à un ligand met en évidence un important mouvement du pouce entraînant la quasi disparition de la cavité dans laquelle se complexe le duplex matrice/amorce [20].

Il a été montré par mutagenèse dirigée que certains  $\alpha$ -aminoacides dans la séquence de p66 sont essentiels dans la catalyse : il s'agit notamment des acides aspartiques en positions 110, 185 et 186, localisés sur la paume. Les mutants de la RT (où ces résidus ont été remplacés) ne montrent pas d'activité. D'un autre côté, la présence de cations divalents dans le milieu ( $Mn^{2+}$  et surtout  $Mg^{2+}$ ) est également essentielle pour l'activité catalytique. Par analogie avec l'ADN polymérase I d'*E. coli* (fragment de Klenow) qui a également ces caractères, un schéma mécanistique simplifié a été proposé [21]. L'étape principale serait la stabilisation d'un état de transition dans lequel le phosphore  $P_{\alpha}$  du groupement triphosphate du substrat est pentavalent. Au moins deux cations  $Mg^{2+}$  stabiliseraient l'ensemble de la structure par liaison avec les acides aspartiques 110, 185 et 186 (soit directement, soit par l'in-

termédiaire d'une molécule d'eau), avec un oxygène du groupement phosphoryle en  $\alpha$ , avec l'anion oxygéné en 3' de l'extrémité de l'amorce et enfin avec le groupement pyrophosphate ( $P_{\beta}P_{\gamma}$ ) qui s'élimine (fig 5) [21]. Si ce schéma réactionnel est valide, il n'est pas étonnant que la plus petite variation de structure par rapport à celle des 5'-triphosphates de nucléosides naturels puisse diminuer l'activité enzymatique. Ainsi, le remplacement de l'oxygène en 5' du 5'-triphosphate de 2',3'-didésoxyuridine (ddUTP : inhibiteur très efficace) par un méthylène supprime totalement l'activité polymérase de la RT [22]. Dans la mesure du possible, il paraît souhaitable que le chimiste de synthèse tienne compte de ce modèle avant d'envisager la synthèse de nouveaux analogues nucléosidiques inhibiteurs potentiels de la RT.

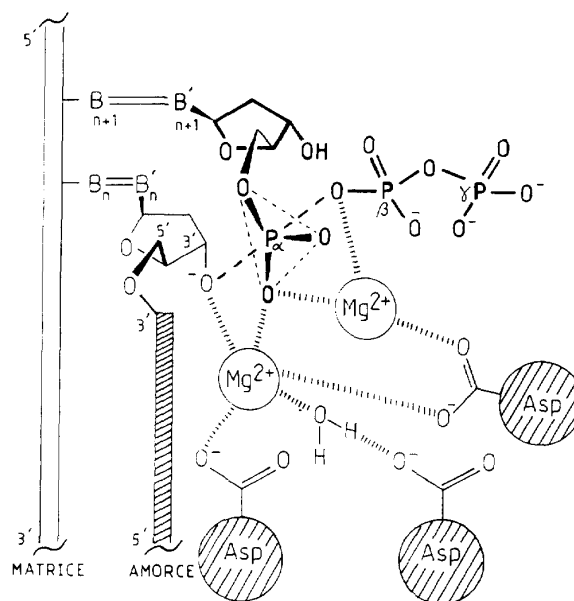


Fig 5

### Nouvelles voies d'inhibition de la transcriptase inverse ouvertes par les progrès récents de la connaissance de la molécule

Les importantes évolutions dans la connaissance de la structure cristallographique de RT et de son mécanisme catalytique constituent des outils essentiels pour l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de la RT. Elles ont suggéré de nouvelles stratégies anti-VIH potentielles que nous allons décrire.

#### Inhibiteurs bi-ligands

Nous avons vu que la détermination de la structure de la RT a permis de caractériser deux sites de complexation différents et relativement proches pour deux types de ligands, d'une part les nucléoside-5'-triphosphates, d'autre part les INNRT. Ceci a récemment suggéré la possibilité de mise au point d'inhibiteurs de la RT de type bi-ligands, se complexant à la fois dans les

deux sites sur chaque molécule d'enzyme [1, 23]. Ce type d'approche est bien connu, notamment dans le cas des nucléoside- et nucléotide kinases qui sont puissamment inhibées par des composés du type bis-(5'-nucléosidyl)oligophosphates ( $Ap_nA$  ou  $dTp_nA$  ( $n = 4, 5, 6$ )) dans lesquels deux noyaux nucléosides sont joints par un «pont» polyphosphate de longueur variable. L'efficacité de ces inhibiteurs symbolisés par A-B peut s'expliquer par le fait que la complexation d'une partie (A) de l'inhibiteur bi-ligand dans son site spécifique accroît considérablement la concentration «locale» de la partie B relativement à son propre site de complexation, par rapport aux complexations des inhibiteurs A et B pris séparément, et si toutefois la géométrie moléculaire est favorable [24, 25].

La partie A de l'inhibiteur bi-ligand proposé serait ainsi un 2',3'-didésoxynucléoside-5'-triphosphate et la partie B un INNRT (du type Névirapine, TIBO....) [1]. Par ailleurs, il a été récemment montré par des mesures de fluorescence que le 5'-triphosphate de la 2',3'-didésoxythymidine substituée en position 5 par un noyau fluorescéine (*cf.* 14) se complexait à la RT presque aussi bien que dTTP non substitué et constitue un excellent substrat [4, 26]. Cela suggère, par exemple, la structure possible 13 pour un inhibiteur bi-ligand de la RT (fig 6), et ce d'autant plus que le synthon 15 est disponible commercialement [27]. Naturellement, cette approche implique une relative indépendance entre les processus de complexation dans les deux sites de la RT et une absence d'effets allostériques (à «longue distance») négatifs importants. Cette nouvelle voie utilisant des composés bi-ligands est d'autant plus intéres-

sante qu'il a été démontré que l'utilisation de mélanges de plusieurs inhibiteurs limitait les risques de résistance du virus.

#### *Inhibiteurs de la dimérisation de la transcriptase inverse*

Une autre possibilité d'inhibition du VIH qui reçoit actuellement une attention particulière à la suite de la publication de la structure tridimensionnelle de la RT est le contrôle du processus de dimérisation de l'enzyme [28]. Seul le dimère p66/p51 de la RT est catalytiquement actif, alors que les sous-unités p66 ou p51 isolées sont inactives. Le processus de dimérisation amène en contact plusieurs sous-domaines des monomères. Ce sont surtout des interactions hydrophobes au niveau des domaines dits de «connexion» entre les sous-unités p66 et p51 qui assurent la stabilité du dimère [12, 29]. La présence de résidus tryptophane stratégiquement placés dans les zones de contact permet une étude cinétique ou à l'équilibre du processus de dimérisation de la RT par variation de fluorescence. Un mécanisme en deux étapes a été proposé : association des deux sous-unités formant un intermédiaire dimère dépourvu d'activité enzymatique suivie d'un important changement de conformation correspondant à l'interaction du pouce de p51 avec le domaine RNase-H de p66 et le placement des «doigts» de p51 dans le site catalytique de polymérisation de p66 [30]. *In vivo*, la RT provient de la maturation de la polyprotéine gag-pol par la protéase du VIH : bien qu'à l'heure actuelle le mécanisme ne soit pas clairement établi, il nécessite une association initiale de deux sous-unités p66 adjacentes.

La connaissance du mécanisme de dimérisation de la RT et de sa structure à haute résolution a suggéré l'utilisation de peptides de petites tailles correspondant aux zones de contact entre p66 et p51 au sein du dimère et susceptibles d'inhiber la dimérisation. A ce jour, l'utilisation de peptides 19-mères s'est révélée efficace dans l'inhibition *in vitro* de la dimérisation de l'enzyme du VIH-1 et du VIH-2, en se complexant aux monomères p51 et p66. On peut espérer qu'à court terme une synthèse de peptides plus adaptés ou d'analogues peptidiques moins sensibles à la protéolyse et pouvant diffuser plus facilement à travers la membrane cellulaire pourra conduire à une inhibition encore plus efficace de l'association de p66 et p51, et par conséquent empêcher la replication du VIH [28].

Cette stratégie d'inhibition des interactions essentielles entre protéines virales présente de nombreux avantages. Ainsi, les inhibiteurs peptidiques de la dimérisation de la RT de VIH-1 sont également de puissants inhibiteurs de la dimérisation de la RT de VIH-2 [28], ce qui s'explique par l'existence d'une homologie structurale importante entre les transcriptases inverses du VIH-1 et du VIH-2. De plus, le risque d'apparition de mutants résistants est limité par le fait que ces inhibiteurs affectent des sites moléculaires indispensables à la mise en œuvre de la forme active de la RT. Cette stratégie de mimétisme peptidique qui est actuellement développée dans le cas de la RT est très séduisante : ainsi, il a été récemment montré que des analogues de peptides courts inhibent *in vivo* des interac-

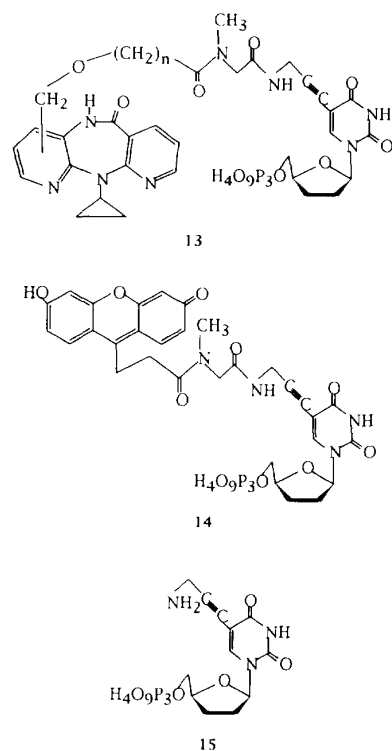


Fig 6

tions protéine-protéine essentielles au cycle du virus de l'Herpes simplex [31].

#### *Interactions entre la RT et des duplex Matrice/Amorce modifiés*

Il est clair que la conception *rationnelle* d'inhibiteurs puissants de la RT analogues de nucléoside-5'-triphosphates ou de duplex matrice/amorce passe obligatoirement par la connaissance de la structure de la RT et, en particulier, de l'organisation des chaînes latérales des résidus d' $\alpha$ -aminoacides dans la structure et les zones d'interactions avec les substrats. A l'heure actuelle, les structures cristallographiques (positions des C $\alpha$  et des chaînes latérales des résidus d' $\alpha$ -aminoacides) des complexes de la RT sont accessibles à partir de la Protein Data Bank (PDB). Les paramètres structuraux fournis par les groupes de Steitz [13], de Arnold [1] et de Harrison [20] sont répertoriés dans la PDB sous les références 1HVT, 1HMI et 1HMZ, respectivement [32]. La situation évolue et devrait permettre très rapidement de tenter l'optimisation des facteurs qui influencent la complexation d'un ligand donné à la RT avant sa synthèse et son évaluation [19, 32].

On a vu précédemment que les essais d'inhibition de la RT par les analogues de nucléosides ou des INNRT ont été beaucoup plus nombreux qu'à partir d'analogues oligonucléotidiques non antisens d'amorce, de matrice ou leur duplex. Les raisons en sont vraisemblablement la difficulté de pénétration cellulaire des oligonucléotides ainsi que leur manque de spécificité vis-à-vis de l'enzyme. La connaissance de la structure du complexe entre la RT et le duplex matrice/amorce a révélé que la plupart des mutations (changement de la nature de chaînons d' $\alpha$ -aminoacides) qui induisent la résistance à l'inhibition par les analogues de nucléosides sont localisées dans des régions interagissant avec le duplex matrice/amorce et non dans le site de fixation des inhibiteurs nucléosidiques [8, 19]. En se basant sur ces informations structurales, l'une des nouvelles voies possibles d'inhibition de la RT pourrait être l'utilisation d'analogues d'amorce ou de matrice modifiés de telle sorte qu'il y ait interaction avec la structure protéique au niveau des points de contact essentiels entre protéine et oligonucléotide. L'avantage d'une telle approche est que ces inhibiteurs seraient par constitution très spécifiques de la RT (par rapport aux autres ADN polymérases cellulaires). Une telle stratégie pourrait peut être aussi permettre de limiter les problèmes de résistance à l'inhibition à cause de la multiplicité des points de contact à la surface de la cavité dans laquelle se complexe le duplex matrice/amorce [33].

La conception de tels inhibiteurs spécifiques analogues oligonucléotidiques du type précédent implique le choix de groupements chimiques «complémentaires» pouvant s'associer de façon covalente ou non au niveau des régions de contact protéine-oligonucléotides. Une démarche à suivre pour la mise au point de tels inhibiteurs pourrait être la suivante : (i) identification des points de contact sur l'enzyme et le duplex et délimitation des structures **locales** peptidiques en interaction, (ii) conception de groupements complémentaires de ces sites protéiques tenant compte des divers types

d'interactions stabilisantes susceptibles d'être créées : par exemple, liaisons hydrogène, interactions dipolaires ou hydrophobes (la nature essentiellement hydrophobe du site actif a été soulignée [34]). L'élaboration de tels groupements présente certainement des difficultés [35] mais peut être aidée par l'utilisation de logiciels de modélisation moléculaire bien adaptés qui sont développés actuellement [36, 37], (iii) synthèse d'analogues oligonucléotidiques substitués (en position 2' ou sur les hétérocycles) par les groupements définis précédemment.

Un premier pas vers la mise au point de tels inhibiteurs oligonucléotidiques de la RT a été récemment tenté avec l'étude des poly-2'-O-(2,4-dinitrophényl)-oligo(A), et poly-2'-O-(3-fluoro-4,6-dinitrophényl)-oligo(A) [33]. Ces oligonucléotides, particulièrement à l'état d'hybrides avec poly(dT), inhibent plusieurs types de transcriptases inverses (y compris les RT du VIH-1, du VIH-2 et de certains mutants) mais sont inactifs vis-à-vis des ADN polymérase I et ARN polymérase II cellulaires. Selon les auteurs, l'affinité de ces DNP-oligonucléotides pour les RT serait due à la stabilisation de la conformation en hélice de DNP-poly(A) ou double hélice dans le cas du duplex DNP-poly(A)/poly(dT) permettant une meilleure complexation dans le site actif de la RT. Le polymère fluoré inhibe l'enzyme de manière irréversible par établissement de liaisons covalentes au niveau du site actif (probablement par substitution nucléophile des atomes de fluor). Toutefois, les chaînes latérales des  $\alpha$ -aminoacides de la structure protéique impliqués dans ces réactions n'ont pas été identifiées [33].

#### **Conclusion**

L'étude récente de la dynamique de prolifération du VIH-1 en début d'infection [38, 39] et les résultats décevants de la mise au point d'un vaccin suggèrent que des combinaisons de drogues ciblées sur la RT, la protéase et l'intégrase du virus représentent la meilleure chance d'inhiber la réplication du virus en permettant au système immunitaire de prendre le dessus.

Dans ce contexte, les déterminations récentes des structures cristallines de la Transcriptase Inverse du VIH-1, à partir de complexes soit avec un duplex matrice/amorce soit avec un inhibiteur non nucléosidique, viennent à point en permettant de larges avancées dans la compréhension des mécanismes de la catalyse enzymatique, de l'inhibition et de la résistance à l'inhibition. Le rythme actuel des publications laisse prévoir que la structure d'un complexe de l'enzyme et d'un inhibiteur nucléosidique sera bientôt connue. A côté des méthodes existantes de conception d'inhibiteurs de la RT largement développées, la connaissance de la structure de l'enzyme a suggéré de nouvelles voies possibles d'inhibition, certaines décrites dans ce mémoire. Ces méthodes sont activement étudiées à l'heure actuelle. Les premiers résultats sont encourageants et permettent de répondre par l'affirmative à la question posée dans le titre de ce mémoire, ce qui devrait inciter les chimistes organiciens et bioorganiciens à proposer de nouvelles idées.

## Références

- 1 Nanni RG, Ding J, Jacobo-Molina A, Hughes SH, Arnold E, *Perspectives in Drug Discovery and Design* (1993) 1, 129
- 2 Reardon JE, *J Biol Chem* (1993) 268, 8743
- 3 Goody RS, Müller B, Restle T, *FEBS Lett* (1991) 291, 1
- 4 Divita G, Müller B, Immendorfer U, Gautel M, Rittinger K, Restle T, Goody RS, *Biochemistry* (1993) 32, 7966
- 5 Rittinger K, Divita G, Goody RS, *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92, 8046
- 6 De Clercq E, *Aids Research and Human Retroviruses* (1992) 8, 119
- 7 Balzarini J, *Pharmacy World and Science* (1994) 16, 113
- 8 Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, Pauwels R, Andries K, Janssen PAJ, Arnold E, *J Mol Biol* (1994) 243, 369
- 9 Pauwels R, Andries K, Debyser Z, Van Daele P, Schols D, Stoffels P, De Vreese K, Woestenborghs R, Vandamme AM, Janssen CGM, Anne J, Cauwerbergh G, Desmyter J, Heykants J, Janssen MAC, De Clercq E, Janssen PAJ, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90, 1711
- 10 Lisiewicz J, Sun D, Weichold FF, Thierry AR, Lusso P, Tang JY, Gallo RC, Agrawal S, *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91, 7942
- 11 Maury G, Elalaoui A, Morvan F, Müller B, Imbach JL, Goody RS, *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 186, 1249
- 12 Restle T, Müller B, Goody RS, *J Biol Chem* (1990) 265, 8986
- 13 a) Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA, *Science* (1992) 256, 1783  
b) Rice PA, Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Steitz TA, *Int Antiviral News* (1992) 1, 4
- 14 Smerdon SJ, Jäger J, Wang J, Kohlstaedt LA, Chirino AJ, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA, *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91, 3911
- 15 Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clarq AD, Lu X, Tantillo C, Williams RL, Kamer G, Ferris AL, Clarck P, Hizi A, Hughes SH, Arnold E, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90, 6320
- 16 Pelletier H, Sawaya MR, Kumar A, Wilson SH, Kraut J, *Science* (1994) 264, 1891
- 17 Sousa R, Chung Y, Rose JP, Wang B, *Nature* (1993) 364, 593
- 18 a) Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, Keeling J, Darby G, Jones Y, Stuart D, Stammers D, *Struct Biol* (1995) 2, 293  
b) Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D, *Struct Biol* (1995) 2, 30
- 19 Boyer PL, Tantillo C, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Ding J, Arnold E, Hughes SH, *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91, 4882
- 20 Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, Woolf DJ, Debouck C, Harrison SC, *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92, 1222
- 21 Steitz TA, *Current Opinion in Structural Biology* (1993) 3, 31
- 22 Benzaria S, Maury G, Gosselin G, Rittinger K, Divita G, Goody RS, Imbach JL, *Antiviral Chem Chemother* (1994) 5, 221
- 23 Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA, *Science* (1995) 267, 988
- 24 Jencks WP, *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78, 4046
- 25 Reinstein J, Vetter IR, Schlichting I, Rösch P, Wittinghofer A, Goody RS, *Biochemistry* (1990) 29, 7440
- 26 Müller B, Restle T, Reinstein J, Goody RS, *Biochemistry* (1991), 30, 3709
- 27 MWG Biotech, Göttingen, RFA
- 28 Divita G, Restle T, Goody RS, Chermann JC, Baillon JG, *J Biol Chem* (1994) 269, 13080
- 29 Divita G, Restle T, Goody RS, *FEBS Lett* (1993) 324, 153
- 30 Divita G, Rittinger K, Geourjon C, Deléage G, Goody RS, *J Mol Biol* (1995) 245, 508
- 31 Lluzzi M, Déziel R, Moss N, Beaulieu P, Bonneau A M, Bousquet C, Chafouleas JG, Garneau M, Jaramillo J, Krogsrud RL, Lagacé L, MacCollum RS, Nawoot S, Guindon Y, *Nature* (1994) 372, 695
- 32 Yadav PNS, Yadav JS, Arnold E, Modak MJ, *J Biol Chem* (1994) 269, 716
- 33 Kang I, Wang JH, *J Biol Chem* (1994) 269, 12024
- 34 Wang J, Smerdon SJ, Jäger J, Kohlstaedt LA, Rice PA, Friedman JM, Steitz TA, *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91, 7242
- 35 Mutter M, *Angew Chem Int Ed Engl* (1985) 24, 639
- 36 Cohen NC, Blaney JM, Humblet C, Gund PS, Barry DC, *J Med Chem* (1990) 33, 883
- 37 Geourjon C, Deleage G, *Protein Engineering* (1994) 7, 157
- 38 Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM, *Nature* (1995) 373, 117
- 39 Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M, *Nature* (1995) 373, 123