



HAL
open science

Étude d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la rétrotranscriptase et de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1).

J. Didierjean

► **To cite this version:**

J. Didierjean. Étude d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la rétrotranscriptase et de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1).. Biochimie [q-bio.BM]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2005. Français. NNT: . tel-00128127

HAL Id: tel-00128127

<https://theses.hal.science/tel-00128127>

Submitted on 30 Jan 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**ETUDE D'UNE NOUVELLE CLASSE D'INHIBITEURS
DE LA RETROTRANSCRIPTASE ET DE L'INTEGRASE
DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE
DE TYPE 1 (VIH-1)**

Présentée
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
Discipline □ Sciences du vivant
Spécialité □ Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Joël DIDIERJEAN

Soutenue le 27 octobre 2005 devant la commission d'examen

Dr. R. MARQUET

Pr. Y. MELY

Dr. F. DARDEL

Dr. S. LITVAK

Pr. B. EHRESMANN

Directeur de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examineur

UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	5
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I: LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)	13
<i>I. Historique, caractéristiques et classification</i>	<i>13</i>
A. Les Retroviridae ou Rétrovirus	13
1. Définition.....	13
2. Caractéristiques générales.....	13
3. Classification des rétrovirus.....	15
B. Le genre Lentivirus	15
C. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	16
D. Découverte et origine des VIH.....	18
1. Découverte	18
2. Origine des VIH	18
<i>II. Le cycle réplcatif du VIH-1</i>	<i>20</i>
A. La phase post-intégrative	21
1. Organisation génétique de l'ADN proviral	21
a. Régions non codantes	21
b. Régions codantes	21
2. Expression de l'ADN proviral	23
a. Phase précoce	23
i. Transcription des ARNm	23
ii. Transactivation Tat/TAR.....	23
iii. Epissage des ARNm viraux.....	25
b. Phase tardive	27
i. L'interaction Rev/RRE et l'export nucléaire des ARNm mono et non épissés.....	27
ii. Traduction des ARNm en protéines et polyprotéines.....	27
3. Assemblage du virion.....	29
a. Recrutement des protéines virales dans l'assemblage.....	29
b. Recrutement des ARN	30
i. L'ARN viral	30
ii. L'ARNt ₃ ^{lys}	31
c. Autres constituants encapsidés	31
4. Bourgeonnement et maturation du virion.....	33
B. Phase pré-intégrative.....	35
1. Reconnaissance, infection, fusion et entrée du virus dans la cellule hôte	36
2. La décapsidation.....	37
3. La rétrotranscription.....	37
a. La rétrotranscriptase.....	37

i. Structure tridimensionnelle.....	38
* La sous-unité p66	40
* La sous-unité p51	40
ii. Comparaison des structures cristallographiques de la RT.....	40
iii. Le site catalytique polymérase	41
iv. Le site catalytique et l'activité RNase H.....	43
b. Mécanisme de polymérisation de la RT	45
i. Réaction enzymatique d'incorporation des nucléotides	45
ii. Processivité de la RT	46
c. La rétrotranscription.....	47
i. Complexe d'initiation	47
ii. Synthèse de l'ADN «Strong-Stop» (-).....	49
iii. Le premier transfert de brin.....	49
iv. La synthèse du brin d'ADN (-).....	51
v. L'initiation de la synthèse du brin (+).....	51
vi. Le second transfert de brin	51
vii. La terminaison de la rétrotranscription	52
d. Les protéines additionnelles impliquées dans le processus de rétrotranscription.....	52
4. Le transport intranucléaire de l'ADN proviral.....	53
5. L'intégration de l'ADN proviral.....	54
a. L'intégrase.....	54
i. Structure tridimensionnelle.....	54
ii. Activités catalytiques.....	56
b. Mécanisme d'intégration.....	56
CHAPITRE II: L'INHIBITION DU VIH-1.....	59
<i>I. L'apparition de virus résistants</i>	<i>59</i>
A. Liée au manque de fidélité de la rétrotranscriptase	59
B. Liée à la recombinaison	60
<i>II. Les différentes stratégies d'inhibition</i>	<i>60</i>
A. Stratégies utilisées en polythérapies.....	60
1. Les inhibiteurs analogues de nucléosides (NRTIs).....	60
i. Structure des molécules et mode d'action.....	60
ii. La résistance aux NRTIs.....	63
Article : Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication.	
2. Les inhibiteurs non analogues de nucléosides (NNRTIs).....	119
3. Les inhibiteurs de protéase.....	122
4. Les inhibiteurs de fusion, le T-20.....	123
B. La mise en place d'un traitement antiviral.....	125
C. Stratégies en cours de développement.....	128
1. Les inhibiteurs de l'intégrase virale.....	128
2. Les approches vaccinales.....	130
3. L'utilisation de microbicides	133
4. Les autres inhibiteurs en développement	134
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE.....	137

RESULTATS ET DISCUSSION.....	143
CHAPITRE I]INHIBITION DE LA RÉTROTRANSCRIPTASE ET DE L'INTÉGRASE DU VIH-1 PAR LES 3,7-DIHYDROXYTROPOLONES.....	145
<i>I. Objectifs</i>	<i>145</i>
Article : Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, RNase H, and integrase activities by hydroxytropolones.	
<i>II. Résultats – Conclusions</i>	<i>175</i>
CHAPITRE II]MÉCANISME D'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ POLYMÉRISE PAR LES.....	179
3,7-DIHYDROXYTROPOLONES.....	179
<i>I. Stratégie expérimentale</i>	<i>179</i>
<i>II. Détermination des paramètres enzymatiques de l'inhibition</i>	<i>182</i>
1. Généralités	182
2. Variation de la vitesse initiale en présence de SP15.....	182
3. Variation de la vitesse initiale maximale V_{max} en présence de SP15.....	185
4. Réversibilité de l'inhibition par les 3,7-dihydroxytropolones.....	187
5. Les 3,7-dihydroxytropolones ne se fixent pas dans le site de liaison des NNRTIs.....	188
1. Inhibition de la RT Y181C.....	188
2. Inhibition de la RT du VIH-2 et la RT de MLV.....	189
6. Les 3,7-DHT ne dissocient pas la forme active, hétérodimérique, de la RT du VIH-1	191
7. Les 3,7- dihydroxytropolones ne fixent pas les acides nucléiques substrats de la RT et de l'IN	191
1. Détermination des K_i d'inhibition de l'activité polymérisation en présence d'un acide nucléique hétérologue	193
2. Analyse de la fixation des 3,7-dihydroxytropolones par fluorescence.....	193
8. Les 3,7-dihydroxytropolones ne sont pas des inhibiteurs de translocation	196
CHAPITRE III : ESSAIS DE CRISTALLISATION D'UN COMPLEXE (AMORCE/MATRICE):RT:DNTP CONTENANT UNE 3,7-DIHYDROXYTROPOLONE	199
<i>I. Obtention du complexe (A/M):RT pontée</i>	<i>199</i>
A. Stratégie.....	199
B. Purification du complexe	200
<i>II. Cristallogénèse.....</i>	<i>204</i>
A. Utilisation de différentes conditions de cristallisation	204
B. Obtention de cristaux	204
CHAPITRE IV]ÉTUDE DE L'EFFET DE LA CONCENTRATION EN MAGNÉSIUM SUR LA RÉTROTRANSCRIPTION DU VIH-1 ET SUR SON INHIBITION	209
<i>I. Objectifs</i>	<i>209</i>
Article : Mg^{2+} dependency of HIV-1 reverse transcription, inhibition by nucleoside analogues and resistance.	
<i>II. Résultats – Conclusions</i>	<i>241</i>
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	243
BIBLIOGRAPHIE	251

ABREVIATIONS

A	adénine
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNt _{1,2} ^{Lys}	isoaccepteurs 1 et 2 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ARNt ₃ ^{Lys}	isoaccepteur 3 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ARNv	ARN viral
ATP	adénosine 5'-triphosphate
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
AZTTP	3'-azido-3'-désoxythymidine 5'-triphosphate
A/M	complexe amorce /matrice
C	cytosine
CA	«capsid protein»
coll.	collaborateurs
CTS	«central termination sequence»
dCTP	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	2', 3'-didésoxyguanosine 5'-triphosphate
DIS	«dimerization initiation site»
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
(dT) ₁₈	octodécanucléotide de thymidine
dTTP	thymidine 5'-triphosphate
dTTP[³ H]	[methyl,1'-2'- ³ H] thymidine 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	éthylène diamine tétracétate de sodium
env	«envelope»
G	guanine
gag	«group-specific antigen»
GTP/GDP	guanosine 5'-triphosphate/diphosphate

Abréviations

h	heure
HMG	«High mobility group»
IC ₅₀	concentration en inhibiteur permettant d'atteindre 50% d'inhibition
IN	intégrase
kb	kilobase
K _d	constante d'équilibre de dissociation
K _i	constante d'inhibition
K _M	constante de Michaelis-Menten
kD	kiloDalton
k _{off}	constante de vitesse de dissociation
k _{pol}	constante de vitesse de polymérisation
LTR	«Long terminal repeat»
MA	protéine de matrice
min	minute
Nef	«Negative factor»
NC	protéine de nucléocapside
NES	«Nuclear export signal»
NLS	«Nuclear localization signal»
NNRTI	inhibiteur non-nucléosidique de la rétrotranscriptase
NRTI	inhibiteur nucléosidique de la rétrotranscriptase
nt	nucléotide
ODN	oligodésoxyribonucléotide complémentaire des 18 nt du PBS
ORF	«Open reading frame»
PBS	«Primer binding site»
PIC	«Preintegration complex»
<i>pol</i>	«Polymerase»
poly(rA)	polyriboadénylate
PPi	pyrophosphate inorganique
PPT	«Polypurine tract»
PR	protéase
Psi	«Packaging signal»
R	redondante
Rev	«Regulator of virion expression»
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase H	«Ribonuclease H»
RRE	«Rev responsive element»

Abréviations

RT	rétrotranscriptase
RT ^{AZTR}	RT résistante à l'AZTTP
RT ^{EQ}	RT portant la mutation E498Q, qui inactive l'activité RNase H
RT ^{QC}	RT portant la mutation Q258C, qui permet le pontage d'un complexe A/M
SA	«Splice acceptor»
SD	«Splice donor»
SDS	dodécylsulfate de sodium
SIDA	syndrome d'immuno-déficience acquise
T	thymine
TAR	«Trans-acting responsive element»
TAM	«Thymidine analogue mutations»
Tat	protéine transactivatrice
TCA	acide trichloroacétique
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
u	unité enzymatique
U	uracile
U3	élément de séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARNv
U5	élément de séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARNv
Vif	«Viral infectivity factor»
Vpr	«Viral protein R»
Vpu	«Viral protein U»
V _{max}	vitesse initiale maximale

AVANT-PROPOS

Laissons parler les statistiques...

	Adultes & enfants vivant avec le VIH	Nouveaux cas infection à VIH chez les adultes et les enfants	Prévalence chez les adultes (%)*	Décès dus au SIDA chez l'enfant et l'adulte
Afrique subsaharienne	25,4 millions	3,1 millions	7,4	2,3 millions
Afrique du Nord & Moyen-Orient	540 000	92 000	0,3	28 000
Asie du Sud & du Sud-Est	7,1 millions	890 000	0,6	490 000
Asie de l'Est	1,1 million	290 000	0,1	51 000
Amérique latine	1,7 million	240 000	0,6	95 000
Caraïbes	440 000	53 000	2,3	36 000
Europe orientale & Asie centrale	1,4 million	210 000	0,8	60 000
Europe occidentale et centrale	610 000	21 000	0,3	6 500
Amérique du Nord	1 million	44 000	0,6	16 000
Océanie	35 000	5 000	0,2	700
TOTAL	39,4 millions [35,9 – 44,3 millions]	4,9 millions [4,3 – 6,4 millions]	1,1 % [1-1,3%]	3,1 millions [2,8 – 3,5 millions]

Figure 1 : VIH-1 et SIDA, statistiques et caractéristiques régionales, année 2004.

* Proportion d'adultes (de 15 à 49 ans) vivant avec le VIH en 2004, d'après les statistiques démographiques de 2004. Dans ce tableau, les fourchettes autour des estimations définissent les limites dans lesquelles se situent les chiffres mêmes, sur la base des meilleures informations disponibles (source OMS/ONUSIDA).



INTRODUCTION

Chapitre I: Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

I. Historique, caractéristiques et classification

A. Les Retroviridae ou Rétrovirus

1. Définition

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui détournent la machinerie de la cellule infectée afin de produire de nouveaux virions. Le Comité International sur la Taxonomie des Virus (ICTV, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>) a adopté une classification des virus en familles, considérées comme l'unité fondamentale de la taxonomie des virus. Cette classification repose sur le type et la taille de l'acide nucléique constituant le génome viral -ADN ou ARN, simple ou double brin, de polarité positive ou négative, mono ou multipartite- ainsi que sur la structure du virion [enveloppé ou non- et sur la stratégie de réplication virale. Les virus qui possèdent une enzyme permettant la rétrotranscription d'ARN en ADN bicaténaire sont regroupés en deux familles, les rétrovirus et les hépadnavirus. Les rétrovirus possèdent une enzyme qui intègre l'ADN proviral généré par la rétrotranscription dans le génome de l'hôte.

2. Caractéristiques générales

En dépit de leur diversité, les rétrovirus possèdent de nombreuses caractéristiques communes (61) []

- Le génome viral est constitué d'un dimère d'ARN monocaténaire de polarité positive et la taille de ces deux molécules d'ARN homologue varie entre 7 et 12 kb.
- L'étape de rétrotranscription convertit l'ARN génomique en une molécule d'ADN proviral bicaténaire qui sera intégrée dans le génome de la cellule hôte. La transcription de cet ADN par la machinerie cellulaire génèrera des transcrits ARN destinés soit à la production des protéines virales, soit à être encapsidés dans de

nouveaux virions afin de constituer l'ARN génomique.

- Les rétrovirus sont des virus dits «**enveloppés**», en raison de la présence d'une bicouche phospholipidique qui renferme la capsid interne ou «**core**» du virus. Cette enveloppe est issue du bourgeonnement à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte et contient entre autres des glycoprotéines d'origine virale permettant la reconnaissance et l'entrée du virus dans la cellule cible.
- La taille des virions varie de 80 à 120 nm de diamètre. Le «**core**» du virus est visible en microscopie électronique et renferme les enzymes nécessaires à la réplication du virus (protéase (PR), rétrotranscriptase (RT) et intégrase (IN)) ainsi que le génome diploïde du virus.

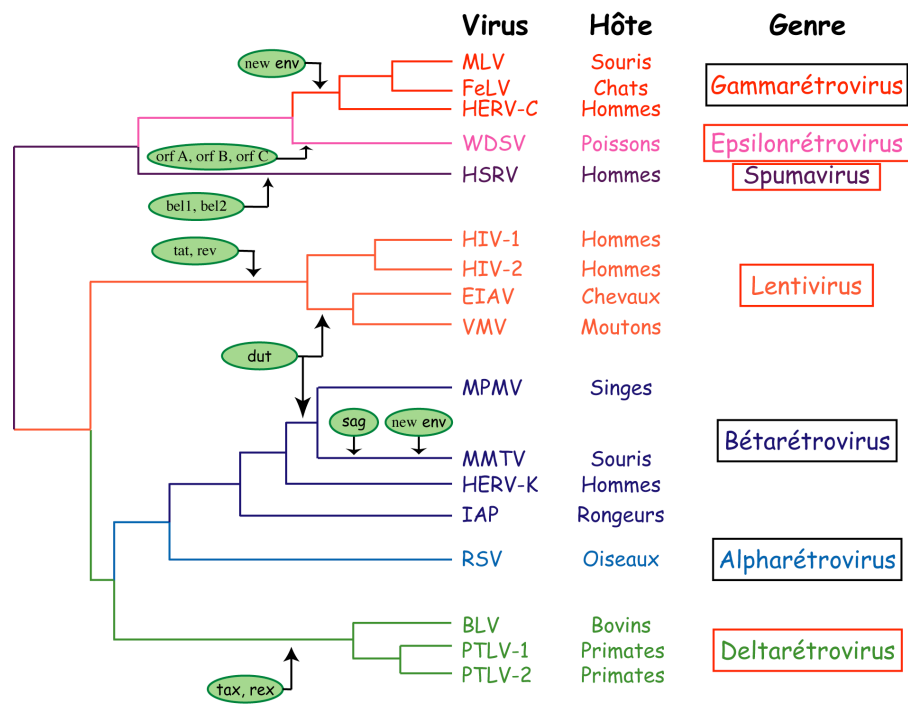


Figure 2 : Arbre phylogénétique des rétrovirus conçu à partir de l'alignement de séquences de la rétrotranscriptase.

La longueur des branches est proportionnelle au degré de divergence. Les rétrovirus dit "simples" sont encadrés en noir, ceux dit "complexes" en rouge. L'ovale vert indique l'acquisition d'un nouveau gène au cours de l'évolution par recombinaison avec le génome de l'hôte ou d'autres virus. HERV-C et HERV-K sont des rétrovirus humains défectueux et IAP un virus-like de rongeur.

3. Classification des rétrovirus

L'alignement des séquences génomiques rétrovirales ainsi que la comparaison des séquences protéiques de la RT, élément protéique le plus conservé chez les rétrovirus, ont permis à l'ICTV de définir une classification des rétrovirus en 7 genres (Figure 2) pouvant se diviser en deux catégories

- Les rétrovirus simples, qui ne possèdent que les gènes *gag*, *pol* et *env* (parfois *dat*) les Alpharétrovirus et Gammarétrovirus (dont certains possèdent un oncogène) et les Betarétrovirus.
- Les rétrovirus complexes, qui codent pour des protéines additionnelles dites régulatrices et auxiliaires : les Deltarétrovirus, Epsilon-rétrovirus, Lentivirus et Spumavirus.

B. Le genre Lentivirus

Les lentivirus regroupent un grand nombre de virus non-oncogènes qui provoquent la mort des cellules infectées. Ils infectent différentes espèces animales dont les primates (VIH-1, VIH-2, SIV), les félins (FIV) ou encore les bovins (BIV). Ces rétrovirus complexes possèdent plusieurs caractéristiques communes

- Les particules virales ont un diamètre de 80 à 100 nm.
- Les protéines d'enveloppe sont glycosylées.
- Le «core» est de forme conique.
- Ils possèdent des protéines auxiliaires et régulatrices (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu chez le VIH-1).
- La taille du génome est supérieure à 9 kb (9,2 kb dans le cas du VIH-1).
- Une phase ouverte de lecture sépare les gènes *pol* et *env*.
- Les gènes *pol* présentent une très grande homologie.
- Il existe un temps de latence très long entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes de la maladie d'où l'appellation «Lentivirus» signifiant virus lent en latin. Cette période d'incubation peut s'étendre sur plusieurs années et jusqu'à 11 ans pour le VIH-1.

- Les symptômes cliniques de l'infection au VIH sont caractéristiques d'un état d'immunodépression aiguë favorisant le développement de maladies opportunistes.

C. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Le lentivirus VIH-1 a pour principale cible les lymphocytes CD4⁺ (Figure 3), clés de voûte du système immunitaire. Néanmoins, il s'attaque également aux monocytes/macrophages, aux cellules dendritiques ainsi qu'à des cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux. La diminution progressive des lymphocytes CD4⁺ provoque un affaiblissement général des défenses de l'organisme qui est à l'origine du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquis (SIDA). L'infection par le VIH-1 est généralement décrite par trois étapes de progression morbide (61) (Figure 4).

- La *primo-infection* par le VIH-1, qui est associée à une virémie élevée dans le plasma. Cette période rétrovirale aiguë favorise la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme puis la réponse immunitaire se développe permettant la diminution du taux de virus plasmatique. Dans 50 à 70% des cas, les signes cliniques de cette phase sont semblables à ceux de la grippe ou de la mononucléose.
- Une *phase asymptomatique* qui intervient après quelques semaines ou quelques mois. Elle est caractérisée par une faible virémie associée à une lente diminution du taux de lymphocytes CD4⁺. L'infection est dite latente et aucune manifestation clinique n'est visible. Cette période d'équilibre entre la production de virus et son élimination peut s'étendre sur plusieurs années.
- Une *phase symptomatique* (SIDA) Le système de défense immunitaire se détériore progressivement, ce qui autorise le développement d'infections opportunistes comme des pneumocytoses, des candidoses oesophagiennes, des lymphomes ou un sarcome de Kaposi. L'état d'activation des cellules du système immunitaire induit une forte augmentation de la réplication virale qui provoque une diminution rapide du nombre de lymphocytes CD4⁺. Les effets cytotoxiques directs du VIH-1, combinés aux infections opportunistes qui se développent, conduisent au décès de la personne infectée.

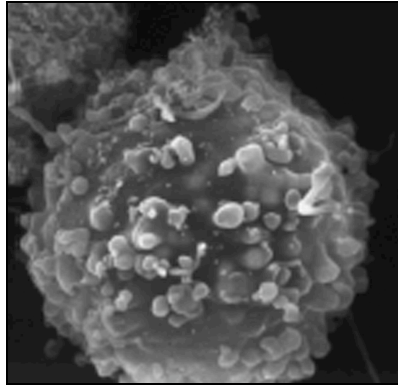


Figure 3 : *Lymphocyte T infecté par le VIH-1, vu en microscopie électronique à balayage.*

Les particules virales du VIH-1 sont visibles sous la forme de petits points ronds parmi les microvilli qui forment des projections au niveau de la surface cellulaire (Lennart Nilsson, Karolinska University Hospital, Stockholm, Suède).

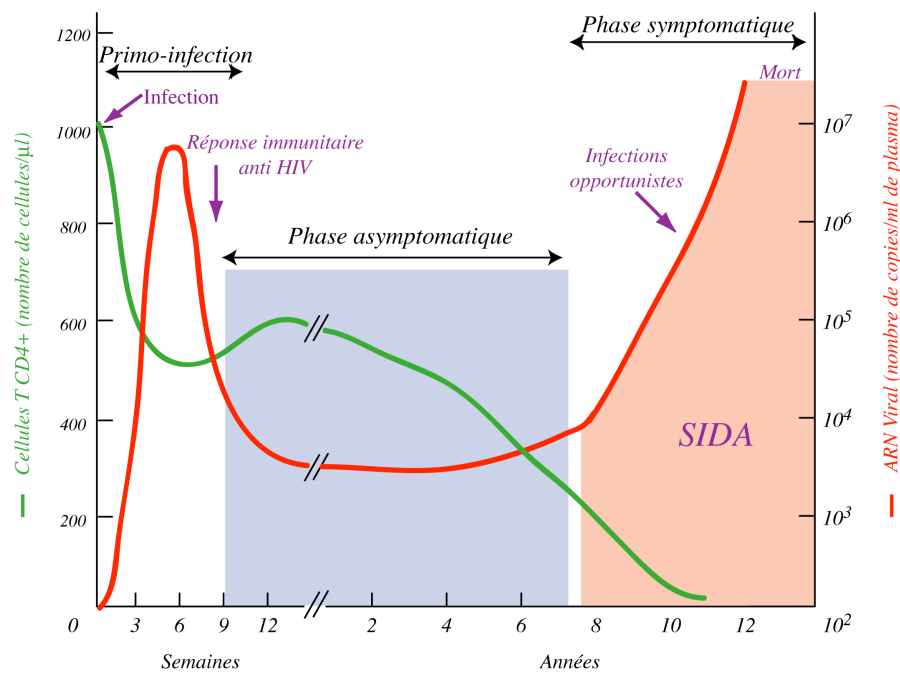


Figure 4 : *Profil d'évolution de l'infection par le VIH-1.*

La progression de la déplétion des lymphocytes CD4+ est représentée en vert et l'évolution de la réplication virale en rouge.

D. Découverte et origine des VIH

1. *Découverte*

Une épidémie d'infections opportunistes, habituellement observées chez des individus immunodéprimés par intervention médicale (greffes, traitements anticancéreux) apparut aux Etats-Unis en 1981. La population touchée se composait de jeunes hommes homosexuels, de toxicomanes et de personnes ayant subi une transfusion sanguine. Dans tous les cas, les patients présentaient une diminution très importante du nombre de lymphocytes T4. Cette affection fut associée à un nouveau syndrome clinique précis, le Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise ou SIDA.

En 1983, l'équipe du Professeur Montagnier (Institut Pasteur, Paris) parvient à isoler un rétrovirus à partir de ganglions d'un patient présentant une lymphadénopathie (12). Il est dénommé LAV (lymphadenopathy-associated virus) et ses caractéristiques se révèlent être proches de celles du HTLV (Human T cell Lymphotropic Virus) découvert en 1980 par le Professeur Gallo (Etats-Unis) (266). Ce dernier isole un autre virus de ce type en 1983 à partir des lymphocytes d'un patient sidéen, le HTLV de type III (116). Tous les tests confirmèrent l'association systématique de ces virus avec le SIDA (236, 292).

En 1986, une commission scientifique propose une dénomination commune : le virus responsable du SIDA est appelé VIH-1. L'équipe du Pr. Montagnier identifie un deuxième virus, le VIH-2, chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest. Ces deux virus présentent des symptômes cliniques ainsi que des propriétés structurales, génétiques et biologiques similaires (58).

2. *Origine des VIH*

L'origine simienne du VIH-1 et 2 ne fait aujourd'hui plus aucun doute (135). De nombreux critères permettent d'affirmer que les petits singes mangabey infectés par le SIVsm (Simian Immunodeficiency Virus from sooty mangabeys) sont la source du VIH-2. Ces deux virus partagent une structure génomique identique codant pour une protéine Vpx non retrouvée chez d'autres lentivirus de primates. En outre, il est phylogénétiquement impossible de séparer ces virus en deux lignées distinctes et il existe également une forte coïncidence entre l'habitat naturel des mangabey et la zone où le VIH-2 est endémique.

Des études reposant sur les mêmes critères ont permis de conclure que le VIH-1 provient de la transmission à l'Homme du SIVcpz infectant une sous-espèce particulière de chimpanzés, les *Pan troglodytes troglodytes*.

Les explications du passage de ces souches de SIV à l'homme sont nombreuses et l'infection due au VIH est considérée comme une zoonose. Ces singes sont souvent pris comme animaux de compagnie ou chassés. Les contacts par morsures ou blessures lors du dépeçage de ces animaux suffisent à expliquer comment les virus simiens peuvent infecter l'homme. Il se pose néanmoins la question de savoir de quelle origine provient l'épidémie du VIH-1 au XXe siècle, étant donné que ces singes sont porteurs de SIV depuis plusieurs centaines de milliers d'années. Il semble que les contaminations éventuelles survenues dans le passé n'ont pas rencontré les conditions épidémiologiques adéquates à la diffusion du virus dans notre espèce. En revanche, les conditions favorisant la pénétration et la diffusion de ces virus chez l'homme sont devenues bien plus propices au XXe siècle, avec entre autres l'urbanisation, les déplacements de population, les procédures médicales d'injection, la toxicomanie, les transfusions sanguines et les comportements sexuels à risque.

II. Le cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle réplcatif du VIH-1 peut se décomposer en deux phases□

- Une première phase, pré-intégrative, qui correspond aux étapes de fixation et d'entrée du virus dans la cellule hôte, à sa décapsidation suivie de la rétrotranscription de l'ARN viral en un ADN proviral qui sera transporté dans le noyau afin d'être intégré dans le génome de la cellule hôte.
- Une phase post-intégrative (Figure 5), comprenant la transcription du provirus intégré, la traduction des protéines virales, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation des virions.

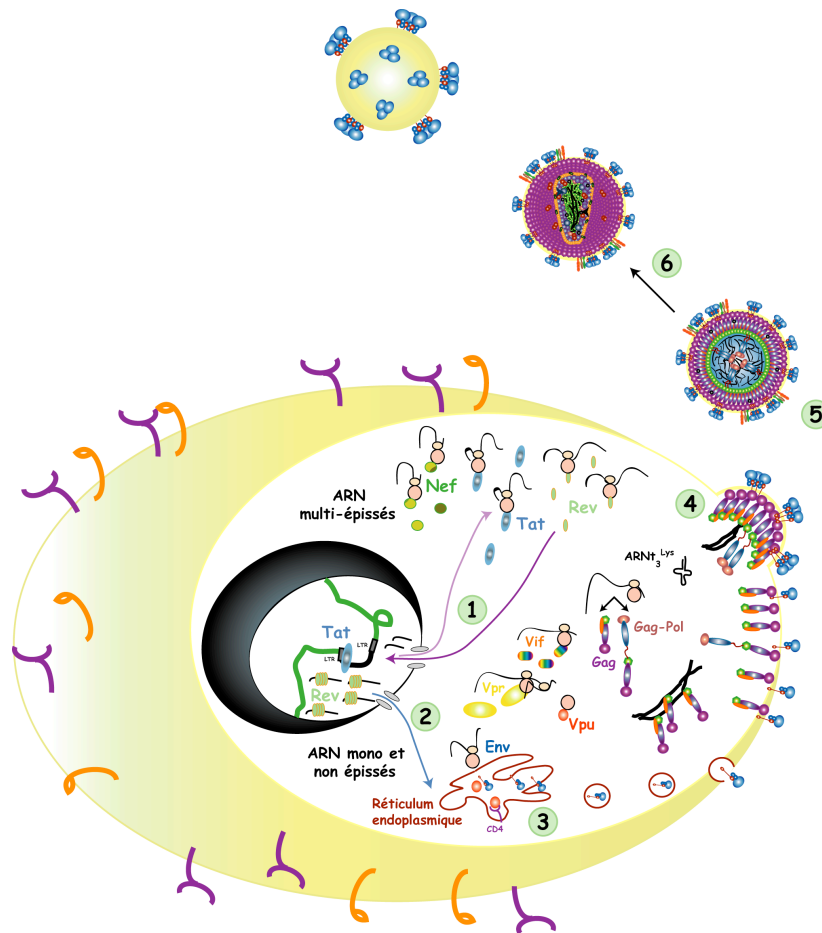


Figure 5 : La phase post-intégrative du cycle réplcatif du VIH-1.

1 : Expression/traduction des ARNm multi-épissés ; 2 : Expression/traduction des ARNm mono- et non-épissés sous l'influence de Tat et Rev ; 3 : Synthèse des protéines Env dans le réticulum endoplasmique et inhibition de l'expression de CD4 par Vpu ; 4 : Assemblage à proximité de la membrane ; 5 : Bourgeonnement d'une particule immature ; 6 : Maturation et obtention d'un virion infectieux.

A. La phase post-intégrative

1. Organisation génétique de l'ADN proviral (Figure 6)

a. Régions non codantes

Le génome du VIH-1 est bordé par deux séquences non codantes identiques ou LTR (Long Terminal Repeat). Ces LTR se subdivisent en séquence U3 (Unique en 3' de l'ARN génomique), R (Redondante) et U5 (Unique en 5' de l'ARN génomique) et sont importants à la fois pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et pour sa transcription (224, 273).

- La séquence U3 (-454 à -1) comporte l'ensemble des signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN viral intégré (Figure 7) :
 - o Le «*core*» du promoteur (-78 à -1), de structure eucaryotique, fixe l'ARN polymérase II et ses cofacteurs par l'intermédiaire d'une boîte TATA et de trois sites de fixation du facteur de transcription SP1. Il permet la transcription d'ARN_v à un taux basal et son altération diminue très fortement l'efficacité de la transcription.
 - o Un domaine activateur (-104 à -79) ainsi qu'un domaine modulateur (-454 à -105) contenant entre autres une région de régulation négative (NRE) permettent au provirus d'adapter son activité à celle de la cellule hôte (261).
- Les séquences R, U5, PBS et leader comportent divers signaux qui agissent dans le contexte de l'ARN viral (transactivation de la transcription, polyadénylation ...).

b. Régions codantes

L'ADN proviral intégré code trois polyprotéines qui sont clivées soit par la protéase virale, soit par une protéase cellulaire. Ces polyprotéines sont Gag, Gag-Pol et Env

- Gag (group-specific antigen) génère les protéines de matrice (MA), de capsid (CA), de nucléocapsid (NC) ainsi que les protéines p2 et p6.
- Pol (polymerase) permet la synthèse des trois protéines enzymatiques virales : la protéase (Pr), la rétrotranscriptase (RT) et l'intégrase (IN).

- Le précurseur polyprotéique glycosylé Env (enveloppe) permet la production d'une protéine de surface (SUgp120) et d'une protéine transmembranaire (TMgp41).

Le virus VIH-1, rétrovirus complexe, code également pour des protéines régulatrices (Tat et Rev) et auxiliaires (Nef, Vif, Vpu et Vpr).

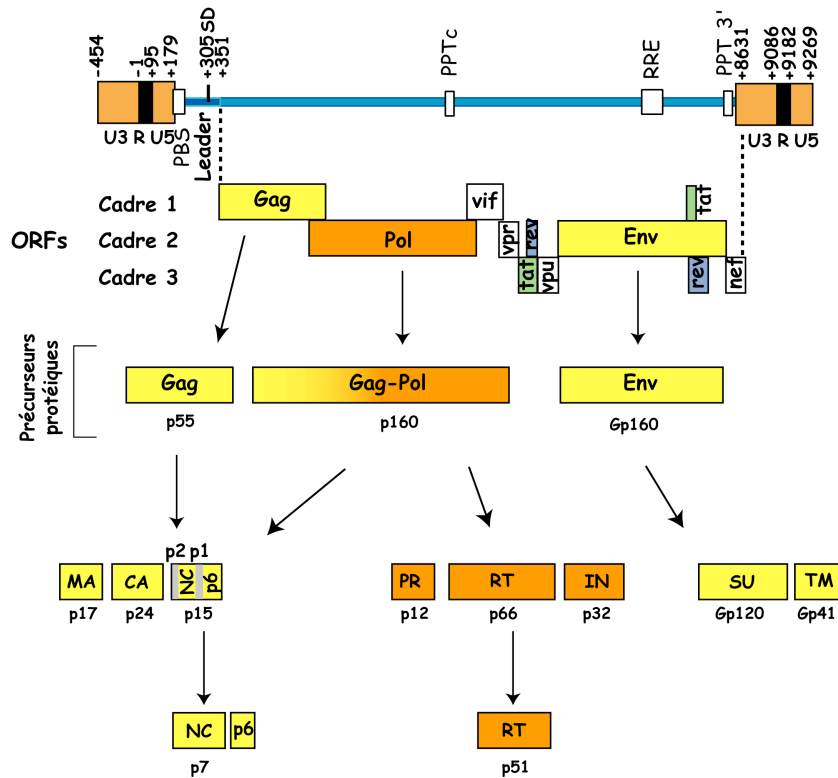


Figure 6 : Organisation génétique du VIH-1.

Le génome rétroviral est encadré de deux séquences appelées LTR, formées des régions U3, R et U5. Trois cadres de lecture permettent de synthétiser les précurseurs protéiques (Gag, Gag-Pol et Env) ainsi que les protéines isolées (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu et Nef). La partie inférieure de la figure montre le devenir des précurseurs en protéines de structure (jaunes) et en protéines enzymatiques (orange).

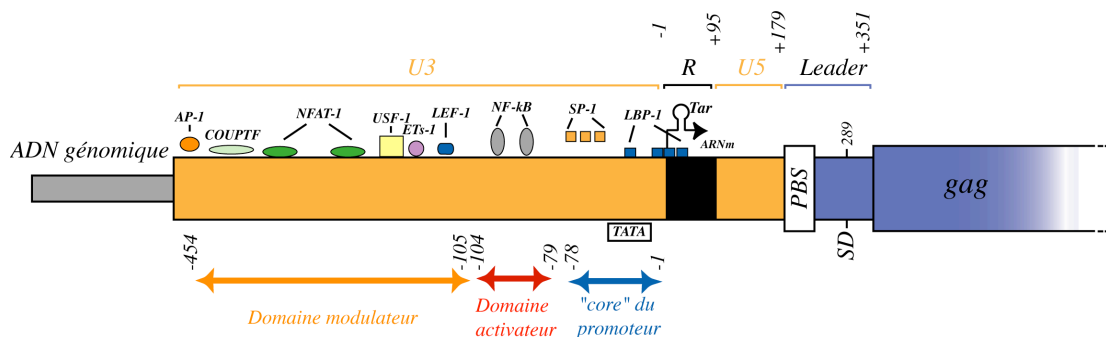


Figure 7 : Enumération non-exhaustive des facteurs transcriptionnels cellulaires se fixant au promoteur du VIH-1, localisé dans la région LTR 5'.

Représentation de la région LTR en 5' de l'ADN proviral intégré. Les régions régulatrices et les facteurs cellulaires associés sont indiqués par des ovales et des carrés. Le détail des différents facteurs transcriptionnels est donné dans (261).

2. Expression de l'ADN proviral

L'expression du provirus dépend de l'état d'activation de la cellule hôte (stress, différenciation cellulaire, activation immunitaire...) ainsi que de la protéine virale Tat. Une phase précoce et une phase tardive de l'expression de l'ADN proviral peuvent être distinguées en fonction du type d'ARN messenger présent dans le cytoplasme.

a. Phase précoce

i. Transcription des ARNm

Une fois intégré le provirus se comporte comme un gène cellulaire et est transcrit par l'ARN polymérase II. Lorsque la cellule est quiescente, seuls de courts ARN capés sont produits en raison de la faible efficacité d'élongation de cette polymérase. Suite à une activation de la cellule, en particulier par la présentation d'un antigène, le facteur nucléaire NF- κ B se fixe sur le domaine activateur de la région U3 du LTR 5' (Figure 7). Une histone acétylase est alors activée et le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II est phosphorylé par une CTD kinase. Ces deux actions combinées vont respectivement permettre un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur ainsi qu'une augmentation du taux d'initiation et d'élongation de la transcription (177, 218). Il en résulte une augmentation générale de l'efficacité de la transcription, aboutissant à une production minimale d'ARNv multi-épissés qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef.

Un signal de polyadénylation (AAUAAA) (Figure 8) présent au niveau d'une tige boucle dans la séquence R permet la polyadénylation de tous les ARN viraux. Bien que présente aux deux extrémités du génome (Figure 6), cette séquence n'est fonctionnelle qu'au niveau du LTR 3'. Le clivage du transcrit ainsi que l'addition de la queue poly-A se fait précisément à la frontière entre les séquences R et U5.

ii. Transactivation Tat/TAR

Le gène *tat* code pour la protéine Tat («TransActivator») qui joue un rôle primordial dans la transactivation de la transcription. Il s'agit d'une protéine comportant trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal d'activation ou de fixation de cofacteurs, un domaine C-terminal impliqué dans la stimulation du «capping» co-transcriptionnel des ARNv (313), ainsi qu'un domaine central basique.

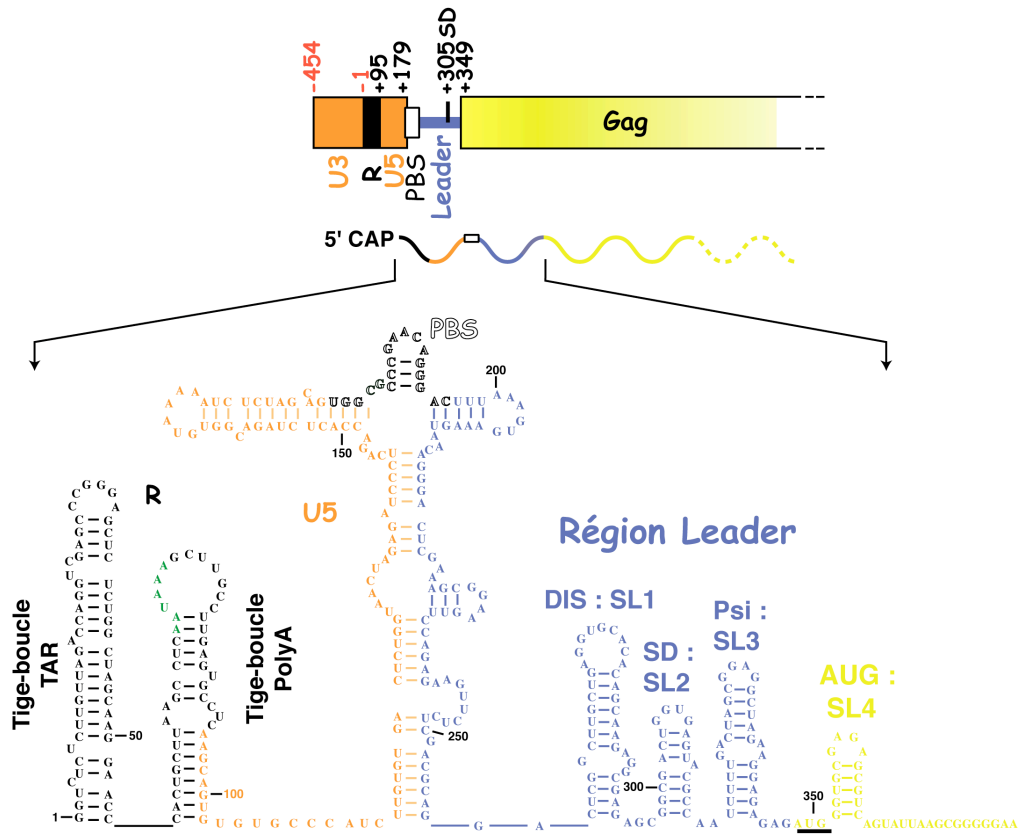


Figure 8 : Structure secondaire de la région 5' de l'isolat MAL du VIH-1 (adaptée de (17)). Le signal de polyadénylation est indiqué en vert.

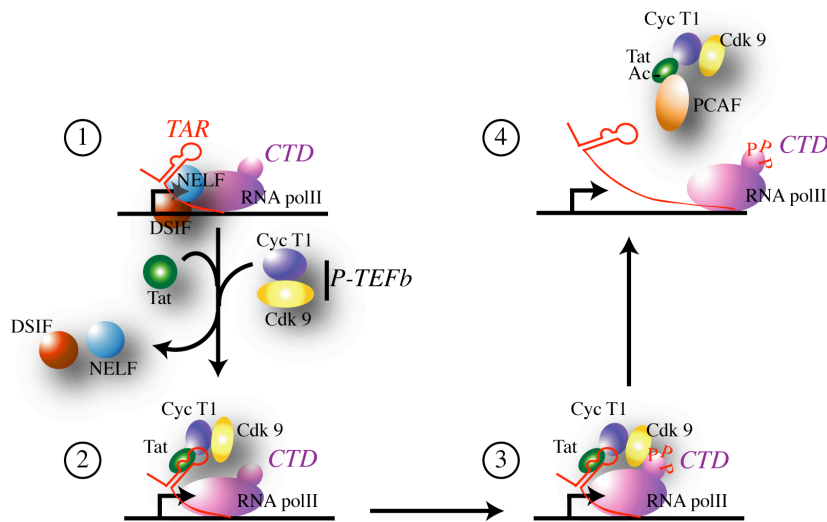


Figure 9 : Modèle de l'action trans-activatrice de Tat.

1 : Synthèse d'un faible taux d'ARN messagers viraux non polyadénylés. L'ARN polymérase hypophosphorylée en son domaine C-terminal (CTD) est peu processive et est associée à des facteurs négatifs d'élongation de la transcription (NELF et DSIF) ; 2 : Fixation de Tat sur le bulge de la tige-boucle TAR en 5' de l'ARNv et recrutement du complexe P-TEFb, comprenant la cycline T1 (qui se lie à la boucle de TAR) et une kinase, Cdk 9 ; 3 : Hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II par Cdk 9 ; 4 : Dissociation du complexe Tat-TAR-Cycline T1:Cdk9 après l'acétylation de Tat et son interaction avec PCAF (p300/CREB binding protein-associated factor) et synthèse de longs transcrits polyadénylés augmentant la production de protéines virales.

Le domaine central basique est impliqué dans le transport nucléaire de Tat et dans sa fixation à la tige-boucle TAR (Trans-Acting Responsive element) (Figure 8) composée des 60 premiers nucléotides de l'ARNv et qui est présente à l'extrémité 5' des transcrits naissants.

La protéine Tat reconnaît spécifiquement la séquence conservée TAR (Figure 9) et recrute le complexe P-TEFb comprenant la cycline T1, qui se lie à la boucle de TAR, et la kinase Cdk9, qui hyperphosphoryle ensuite le domaine CTD de l'ARN polymérase II (pour revue voir (177)). Tat est également impliquée dans une fonction de remodelage de la chromatine via le recrutement d'histones acétyl transférases (HATs) telles que p300 et P/CAF (p300/CREB binding protein associated factor) (228). L'accessibilité au niveau du promoteur et la processivité de l'ARN polymérase II sont augmentées d'un facteur 100, ce qui permet une transcription efficace du génome viral au-delà de TAR (218, 313). Un mode de transactivation de la transcription TAR-indépendant a également été suggéré et ferait intervenir la séquence régulatrice NFkB au niveau de la région «Enhancer» du LTR 5' (18). Le mécanisme moléculaire de cette activation reste néanmoins à clarifier (69).

iii. Epissage des ARNm viraux

Les ARN viraux comportent de nombreux sites donneurs et accepteurs d'épissage (251). Trois types d'ARN sont obtenus

- Les ARN multi-épissés codant pour les protéines Tat, Rev et Nef.
- Les ARN mono-épissés codant pour Env, Vif, Vpr et Vpu.
- Les ARN non épissés codant pour Gag, Gag-Pol et pouvant être encapsidés dans de nouveaux virions en tant qu'ARN génomique.

Dans un premier temps, seuls les ARN multi-épissés sont exportés du noyau, puis les ARN mono et non-épissés sont produits par l'intermédiaire du mécanisme d'épissage alternatif (Figure 10). La transition entre ces deux situations est régulée par la protéine Rev (voir ci-dessous).

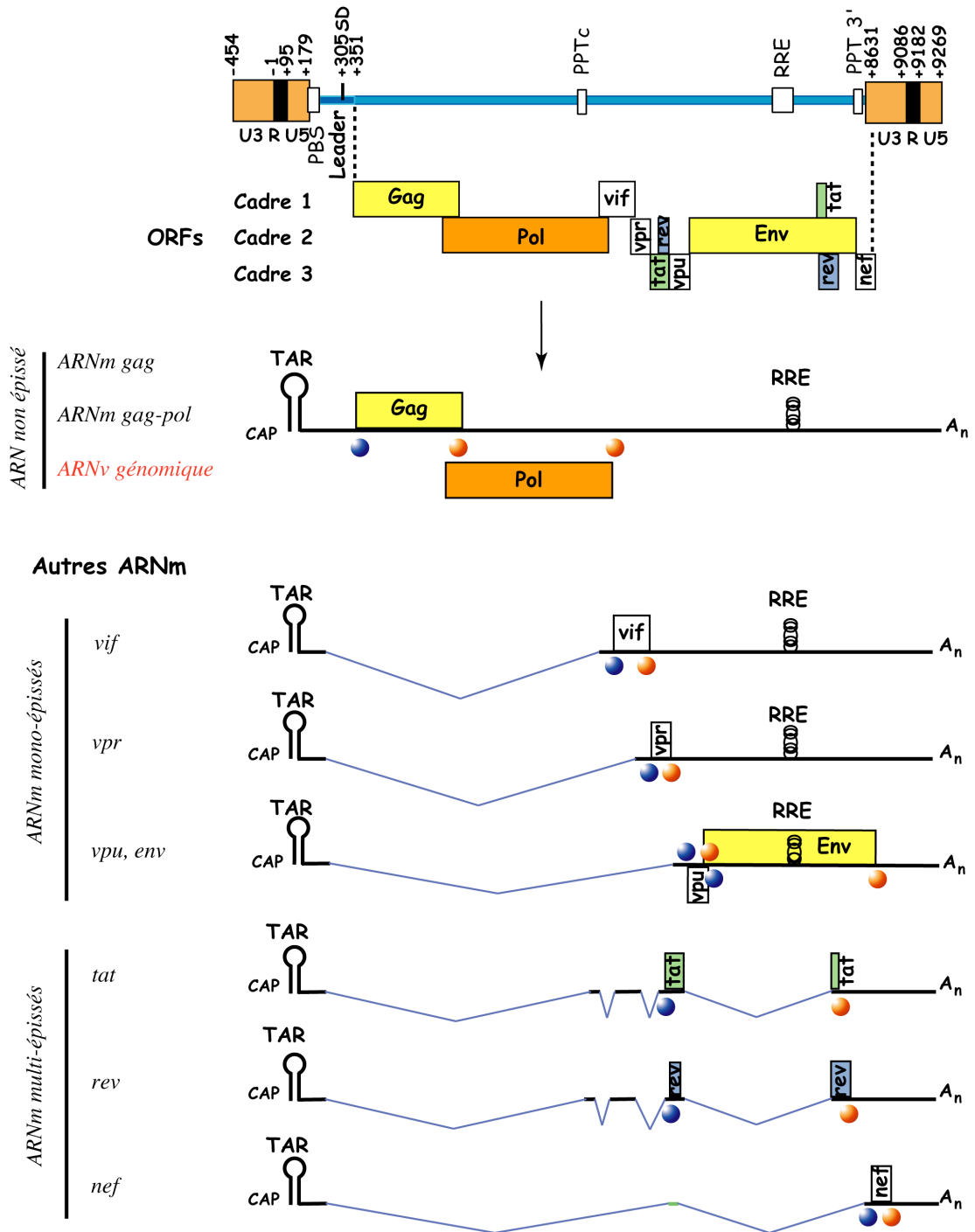


Figure 10 : Profils d'épissage non exhaustif de l'ARN génomique du VIH-1.

Les sites d'initiation et de terminaison de la traduction des ARNm sont symbolisés par des cercles bleus et oranges respectivement. Les protéines issues de la traduction d'un ARNm particulier sont indiquées sur la représentation de cet ARNm.

b. Phase tardive

i. L'interaction Rev/RRE et l'export nucléaire des ARNm mono et non épissés

La fin de la phase précoce est associée à l'export nucléaire des ARNm multi-épissés ainsi qu'à l'augmentation de la concentration cellulaire de Rev. La protéine Rev (Regulator of virion expression) (146) possède un domaine de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal) qui permet son adressage dans le noyau, dans lequel elle interagit spécifiquement avec une région appelée RRE (Rev Responsive Element) présente sur les ARN mono et non-épissés néosynthétisés (Figure 10). La séquence RRE (234 nt) est structurée en tiges-boucles et localisée au niveau du gène *env* (214). La fixation de Rev à une boucle interne du RRE (321) constitue le point de nucléation de sa multimérisation le long de cette région (347). Le signal NLS de Rev est alors masqué tandis qu'un signal d'export nucléaire (NES) de Rev devient accessible. De ce fait, les ARNm mono ou non-épissés sont exportés vers le cytoplasme uniquement lorsque la concentration nucléaire de la protéine Rev est suffisante (Figure 11).

Le domaine NES interagit avec des facteurs d'export nucléaires dont le système Ran GTP/GDP qui fournit l'énergie nécessaire à l'export nucléaire des ARNm vers le cytoplasme (9, 112). Les ARNm sont ensuite traduits ou/et encapsidés, libérant la protéine Rev qui retourne dans le noyau et permet d'autres cycles d'export.

ii. Traduction des ARNm en protéines et polyprotéines

Les ARNm viraux issus de la transcription par l'ARN polymérase II sont capés et polyadénylés, ce qui permet au virus de détourner la machinerie traductionnelle de la cellule hôte. Les protéines virales Tat, Rev, Nef, Vif et Vpr sont produites selon le mode de traduction classique. Il existe néanmoins deux exceptions à ce mode de traduction (Figure 10)

- La traduction d'un ARN messager bi-cistronique qui code la protéine Vpu et le précurseur Env (297) la première ORF code Vpu dont le codon initiateur est de faible efficacité (298) tandis que la traduction de Env est tributaire d'un mécanisme de « leaky scanning » permettant au ribosome de passer outre le codon initiateur de la traduction de Vpu.

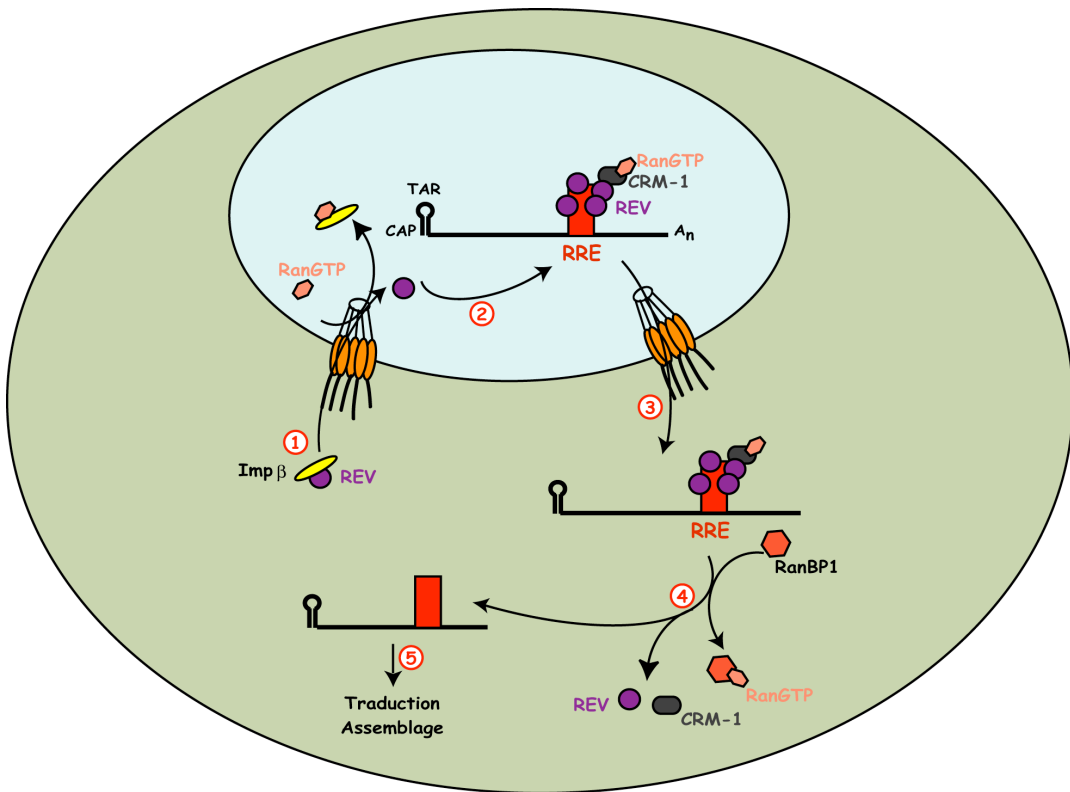


Figure 11 : Régulation de l'export nucléaire des ARN viraux par la protéine virale Rev.

1 : Après sa synthèse dans le cytoplasme, Rev interagit via son domaine NLS avec un facteur d'import nucléaire, l'importine β ; 2 : Une fois dans le noyau, Rev se fixe sur une séquence appelée RRE (Rev Response Element) localisée dans le gène *env* présent dans les ARNm viraux non ou mono-épissés. La multimérisation de Rev sur la séquence RRE masque le signal NLS et dévoile en même temps le signal d'export nucléaire ou NES. Ce motif va interagir avec des protéines d'export nucléaire dont CRM-1. Ran-GTP régule l'association entre Rev et CRM-1 ; 3-4-5 : Dans le cytoplasme, la fixation de RanBP1 à Ran GTP apparaît être la clé pour la dissociation du complexe Rev-CRM-1-Ran-GTP ; 5 : Les ARNm viraux mono ou non-épissés pourront être utilisés par la machinerie cellulaire de traduction et/ou encapsidés (pour les ARNm non épissés) et la protéine Rev retournera dans le noyau où elle permettra d'autres cycles d'export.

Ce mécanisme permet une expression coordonnée des deux protéines.

- Un même transcrit permet la synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol suite à un mécanisme de décalage du cadre de lecture du ribosome se produisant dans 5% des cas. Ce «frameshift» se produit au niveau d'une séquence de «glissement» associée à une tige-boucle en aval (20, 164) et permet le décalage d'un nucléotide (nt) vers l'extrémité 5' de l'ARNm. Le rapport entre la synthèse de Gag et de Gag-Pol est critique pour la propagation du virus (176).

3. Assemblage du virion

a. Recrutement des protéines virales dans l'assemblage

La polyprotéine Gag, myristillée post-traductionnellement au niveau de son extrémité N-terminale, dirige l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions. Elle est suffisante pour organiser la formation des particules virales en l'absence des autres constituants du virion (293). Cinq sous domaines de Gag (Figure 6) sont impliqués dans l'assemblage

- Un domaine N-terminal de la protéine de matrice (MA) un groupement myristyl ainsi que la présence d'une région basique permettent l'ancrage des précurseurs Gag et Gag-pol dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire (128). Cet ancrage se produit préférentiellement au niveau de radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides (38, 252), ce qui d'explique la composition en lipide des membranes virales. La MA interagit directement avec le domaine TM du précurseur Env palmytoylé et facilite son recrutement (64, 114).
- L'extrémité C-terminale de la capsid (CA) est indispensable à la multimérisation des polyprotéines Gag et Gag-Pol (293) et est impliquée dans la stabilité du virion (269).
- Les domaines nucléocapside (NC) et p2 participent au recrutement de l'ARNv (240); NC et p6 à l'encapsidation de la protéine Vpr (260).

b. Recrutement des ARN

Il s'agit d'une étape essentielle de l'assemblage de nouvelles particules virales puisqu'en absence d'ARNv le virus recrute des ARN d'origine cellulaire (245).

i. L'ARN viral

Lors de l'assemblage du virus, deux copies identiques d'ARN génomique (ARNg) sont encapsidées sous forme dimérique (254). La dimérisation semble déjà se produire dans le cytoplasme de la cellule hôte (253) et fait intervenir la région leader de l'extrémité 5' de l'ARNv (Figure 8). Cette séquence est structurée en différentes tiges boucles dont celle du DIS (Dimerization Initiation Site) ou SL1 contenant une séquence palindromique (le plus souvent GUGCAC ou GCGCGC) essentielle à la formation du dimère. La dimérisation est initiée par la formation d'un complexe boucle-boucle entre les séquences palindromiques de deux monomères d'ARN (60, 304) et le passage à un duplex étendu a été observé sur de courts fragments d'ARNg (102, 235, 320), et pourrait éventuellement avoir lieu *in vivo* sous l'action de la NC (244, 280) (Pour revue voir (254)).

La région Leader contient également le site donneur (SD) majeur d'épissage (SL2), la tige boucle contenant le codon initiateur de la traduction (SL4) et une région appelée Psi (SL3).

La tige boucle Psi (Packaging signal) a été identifiée comme étant le site majeur d'encapsidation (19, 202) de l'ARNg via une interaction spécifique avec le domaine NC de Gag. La NC fixe l'ARN à l'aide de deux doigts de zinc interconnectés par une séquence basique (286). Elle fixe SL2 avec la même affinité que SL3 et SL4 semble stabiliser la structure de Psi (4, 5). Le peptide p2, situé entre la CA et la NC de Gag (Figure 6), contribue à la reconnaissance spécifique du signal d'encapsidation et à la régulation de l'encapsidation de l'ARNv (240, 287). D'autres structures comme les tiges boucles TAR et poly(A) (Figure 8) favorisent la sélection de l'ARNg (59).

La multimérisation de Gag (84, 288), médiée par l'ARNv (293), favorise l'incorporation de Gag-Pol et conduit à la formation d'un complexe Gag/Gag-Pol/ARNv (184).

ii. L'ARNt₃^{Lys}

Les rétrovirus utilisent un ARNt d'origine cellulaire comme amorce de la rétrotranscription (223). Dans le cas du VIH-1, les ARNt isoaccepteurs majeurs de la lysine sont spécifiquement encapsidés et seul l'isoaccepteur ARNt₃^{Lys} sert d'amorce à la rétrotranscription (156). Bien qu'un enrichissement de 10 fois des ARNt^{Lys} soit observé entre la cellule infectée et le virus, le rapport ARNt_{1,2}^{Lys}/ARNt₃^{Lys} reste constant (213). Le virion contient ainsi 8 molécules d'ARNt₃^{Lys} et 12 molécules d'ARNt_{1,2}^{Lys} pour 2 molécules d'ARN génomique.

Deux modèles d'encapsidation des ARNt^{Lys} ont été proposés (186) (Figure 12) et font intervenir la LysylARNt synthétase (LysRS) néosynthétisée (132), également encapsidée spécifiquement (45). Ces modèles divergent après la formation du complexe Gag/Gag-Pol/ARNv. Soit le complexe LysRS/ARNt^{Lys} interagit directement avec Gag/Gag-Pol/ARNv, soit la LysRS libre interagit d'abord avec Gag/Gag-Pol/ARNv puis recrute l'ARNt^{Lys}.

La région «Pouce» (voir figure 18) du domaine RT du précurseur Gag-Pol interagit avec l'ARNt₃^{Lys} (185) et stabilise sa présence dans le complexe tandis que la LysRS est recrutée via une interaction avec le domaine C-terminal de la capsid (186). L'encapsidation de la LysRS est indépendante de l'encapsidation des ARNt (43) qui est elle-même indépendante de celle de l'ARNv. Néanmoins la présence de la LysRS est indispensable à l'incorporation des ARNt^{Lys} (115, 132, 166), qui sont retrouvés non aminoacylés dans les virions, contrairement aux ARNt cellulaires (156). L'encapsidation des ARNt^{Lys} ne requiert pas leur aminoacylation (46). De plus, il a été montré que la RT est incapable d'allonger les ARNt₃^{Lys} acylés et qu'elle n'augmente pas la déacylation (278).

c. Autres constituants encapsidés

Les difficultés liées à la purification des particules virales ne permettent pas de définir clairement leur composition. On y retrouve néanmoins de nombreux constituants cellulaires tels que l'actine (339), la cyclophiline A (29), Staufen (241), la LysRS (45) ou Tsg101 (81) qui interagissent respectivement avec la NC, la CA, l'ARN viral, Pol et p6.

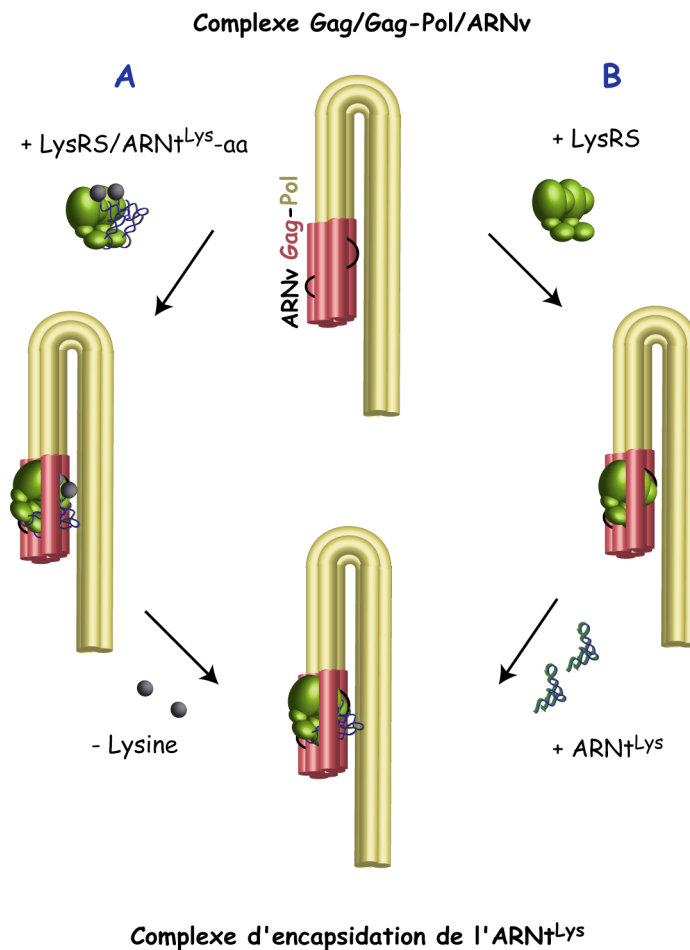


Figure 12 : Représentation schématique de la formation du complexe d'encapsidation de l'ARNt^{Lys} (d'après (187)).

La composition du complexe d'encapsidation tient compte de l'interaction entre Gag et l'ARNv qui facilite la multimérisation de Gag, de l'interaction entre Gag et Gag-Pol, de l'interaction entre Gag et la LysRS et de l'interaction entre Gag-Pol et l'ARNt^{Lys}. Le rapport entre Gag/Gag-Pol/LysRS/ARNt^{Lys} est de 60/6/1/1. Deux mécanismes d'encapsidation sont envisageables. **A** : Le complexe Gag/Gag-Pol interagit avec un ARNt^{Lys} chargé et complexé à la LysRS ; **B** : Le complexe Gag/Gag-Pol interagit tout d'abord avec la LysRS. Ce nouveau complexe interagit ensuite avec un ARNt^{Lys} non chargé.

4. Bourgeoisement et maturation du virion

Le bourgeoisement implique un motif PTAP ou 'late domain', situé dans la région C-terminale de p6 au niveau du précurseur Gag. Ce domaine recrute et lie la protéine cellulaire Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) (118, 226) qui facilite la séparation efficace des membranes cellulaires et virales lors du bourgeoisement. Tsg101 semble fonctionner comme un adaptateur protéique et est impliquée dans plusieurs interactions protéines/protéines à l'intérieur du complexe ESCRT-I (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (227, 314). Ces interactions entre protéines virales et cellulaires permettent d'associer la libération des virions à la machinerie d'exocytose des protéines cellulaires VPS (Vacuolar Protein Sorting).

Les virions néo-formés (Figure 13) ne sont pas infectieux et doivent subir une étape de maturation provoquant des changements conformationnels et morphologiques majeurs. La maturation fait intervenir la protéase virale PR. La protéolyse séquentielle des précurseurs Gag et Gag-Pol (337), modifie l'affinité des protéines virales pour la membrane phospholipidique, ce qui stimule de la libération de virions (252). Il s'agit également d'une étape critique du point de vue morphologique puisqu'elle permet la transformation de particules virales immatures (Figure 13), contenant une couche sphérique de précurseurs Gag associées à la membrane virale, en particules matures (Figure 14) dont le «core» est en forme de cône dense aux électrons.

La libération de la PR du précurseur Gag-Pol est initiée de façon autocatalytique, mais semble être un événement relativement tardif (142). Les travaux de Pettit et al (262) suggèrent des coupures initiales, intra-moléculaires, réalisées par des intermédiaires protéasiques de PR. Dans la particule virale immature (Figure 13), le précurseur MA-CA-p2-NC est attaché à la membrane virale. La coupure entre p2 et NC est essentielle à la condensation du core dense aux électrons, composé de la NC, de l'ARNg dimérique, d'ARNs et de protéines d'origine cellulaire. Le second clivage, entre la MA et CA, libère CA-p2, ce qui génère la condensation de la capsidie et la formation d'une coque sous-membranaire constituée de MA. Le core cônica mature des particules virales infectieuses (Figure 14) est finalement constitué suite au clivage entre CA et p2.

Une nouvelle fonction de la protéine Vif a été récemment suggérée à haute concentration, Vif inhiberait sélectivement la coupure entre p2 et NC, sans inhiber la protéase (2). Il en résulterait une accumulation de précurseurs protéiques non maturés et de ce fait de particules virales non-infectieuses.

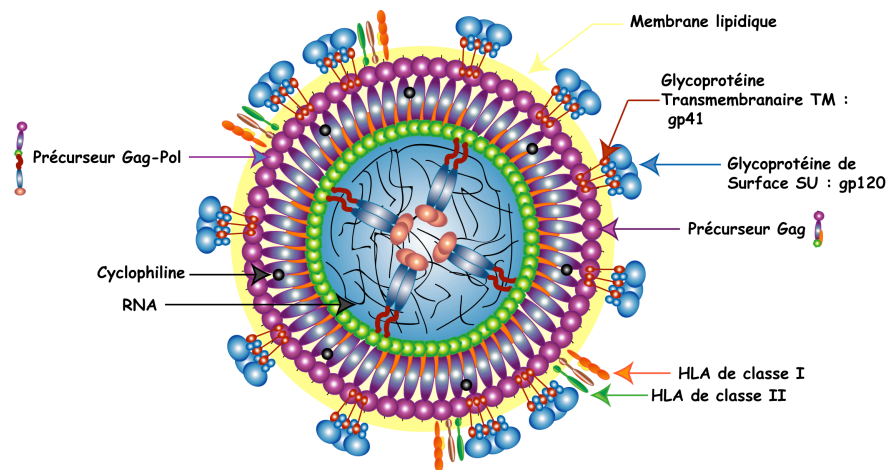


Figure 13 : *Forme immature du VIH-1.*

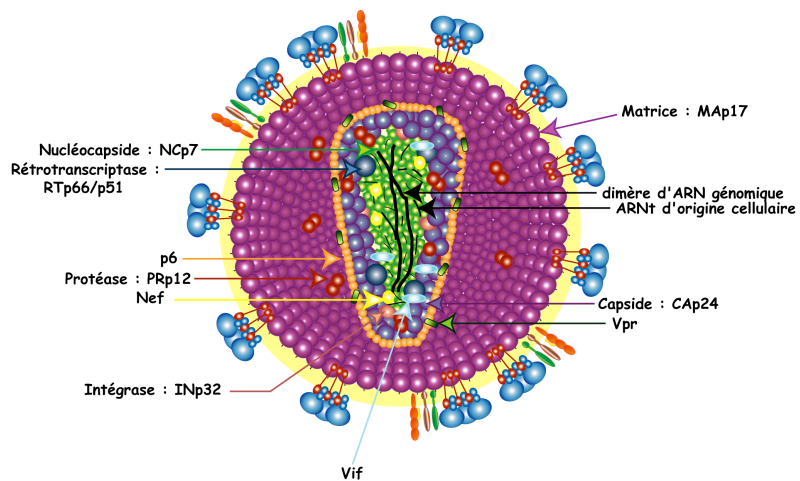


Figure 14 : *Structure de la particule virale infectieuse du VIH-1.*

Représentation schématique indiquant les constituants d'une particule virale mature. Les protéines cellulaires encapsidées ne sont pas indiquées.

B. Phase pré-intégrative (Figure 15)

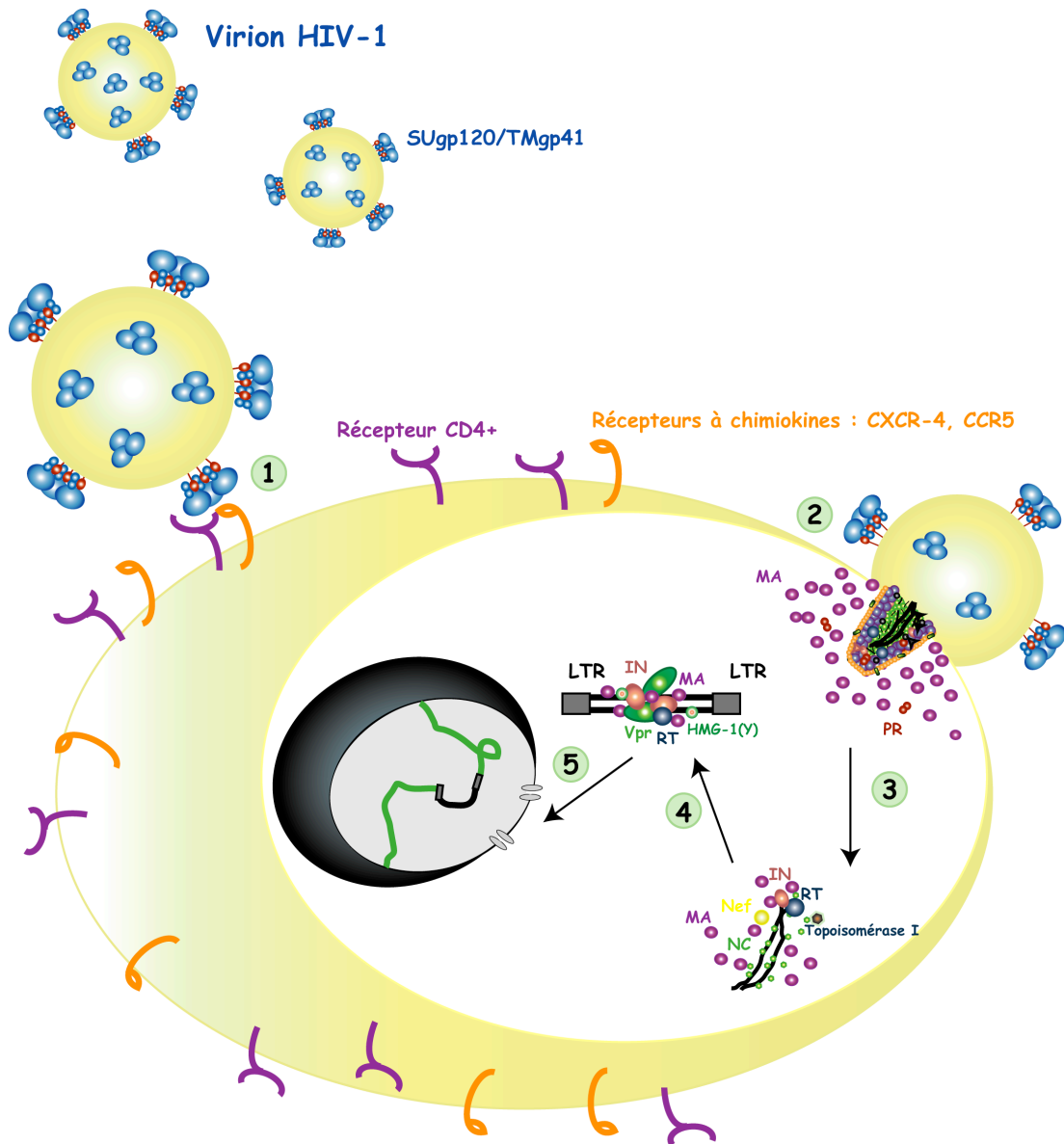


Figure 15 : La phase pré-intégrative du cycle réplcatif.

1 : Fixation SUgp120/CD4⁺-récepteur à chimiokines ; 2 : Fusion des deux enveloppes, entrée du virus dans la cellule et désassemblage ; 3 : Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral double brin ; 4 : Formation du complexe de pré-intégration, PIC ; 5 : Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.

1. Reconnaissance, infection, fusion et entrée du virus dans la cellule hôte

Les particules virales exposent à leur surface deux glycoprotéines issues du précurseur Env, chacune étant organisée sous la forme d'un trimère (Figure 16). Chaque monomère de TMgp41 lie non covalamment un monomère de SUgp120. TMgp41 possède trois domaines □ un endodomaine, un domaine transmembranaire et un ectodomaine tandis que SUgp120 est une protéine de surface (voir figure 16 et 38.A).

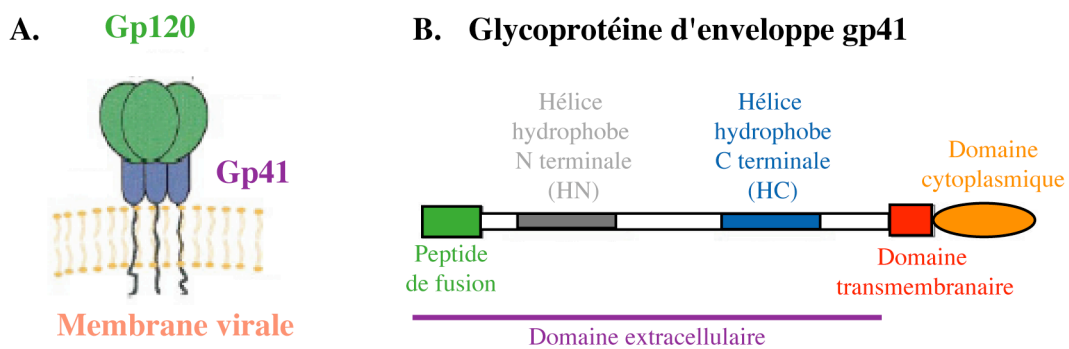


Figure 16 : Structure de la glycoprotéine d'enveloppe gp41.

A : Gp120 est une glycoprotéine de surface liée non covalamment à la glycoprotéine transmembranaire gp41. Gp120 et gp41 s'organisent sous forme de trimères. B : La glycoprotéine d'enveloppe gp41 possède trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire. Le domaine extracellulaire est essentiel pour la fusion membranaire et contient le peptide de fusion, inaccessible dans la conformation native, qui s'ancre dans la membrane de la cellule hôte lors de la fusion, et deux séquences hydrophobes, riches en leucine, formant des hélices □.

L'adhésion des particules virales aux cellules cibles, macrophages et lymphocytes (68, 211), est réalisée suite à la reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur cellulaire CD4. Cette interaction induit un changement conformationnel de gp120 et permet l'exposition d'une boucle, V3. Cette boucle reconnaît ensuite un co-récepteur de la cellule cible, CXCR-4 ou CCR5 (récepteurs aux chimiokines) afin de permettre l'infection. En effet, cette reconnaissance aboutit à l'exposition puis à l'insertion du peptide de fusion de gp41 dans la membrane de la cellule hôte (voir figures 16 et 38.A). Le rapprochement des membranes virale et cellulaire est ainsi facilité et la fusion peut se produire, ce qui libère la capsid dans le cytoplasme de la cellule cible.

Les deux types de co-récepteurs impliqués dans l'infection permettent d'expliquer le tropisme des différentes souches du VIH-1. Les isolats M-tropiques (Macrophage), T-tropiques (lymphocytes T) ou à double tropisme (R5/X4) utilisent respectivement les co-récepteurs CCR5, CXCR-4 ou les deux. L'importance de ces récepteurs est démontrée par l'existence d'individus présentant une résistance innée contre l'infection par des souches M-tropiques et qui possèdent une délétion homozygote, codant 32 aa, dans le gène de CCR5 (207).

2. La décapsidation

Le processus de déstructuration de la capsid virale permet la libération du complexe de rétrotranscription composé de l'ARNv génomique, de l'ARN₃^{Lys} qui sert d'amorce à la rétrotranscription, de protéines virales et cellulaires. Bien que peu connu, le mécanisme de déstabilisation de la capsid serait facilité par la cyclophiline A, une *cis-trans* isomerase associée au «*core*» du virion. Elle induirait de subtils changements au sein des interactions CA-CA et provoquerait ainsi la décapsidation (209). Cette hypothèse reste néanmoins controversée (289).

3. La rétrotranscription

La rétrotranscription, étape de synthèse de l'ADN proviral double brin, requiert un complexe matrice/amorce constitué par l'ARNv hybridé à l'ARN₃^{Lys} et la rétrotranscriptase. La rétrotranscription est couplée à la décapsidation et a lieu essentiellement dans le cytoplasme, au sein d'un complexe ribonucléoprotéique (108, 249). Ce complexe est perméable uniquement aux petites molécules comme les dNTP. En conséquence, il protège l'ARNv des nucléases cellulaires et empêche la dilution dans le cytoplasme de la RT et d'autres facteurs essentiels. Il existe un début de rétrotranscription endogène au virion (157, 350) produisant de courts produits de rétrotranscription. De nombreux facteurs viraux et cellulaires contribuent à l'efficacité de la rétrotranscription cytoplasmique.

a. La rétrotranscriptase

La rétrotranscriptase codée par le gène *pol* est une enzyme qui possède des activités ADN polymérase ARN et ADN-dépendante ainsi qu'une activité RNase H, qui dégrade sélectivement l'ARN dans un duplexe ARN/ADN. Le clivage du précurseur protéique Pol permet d'obtenir les monomères p66.

Ceux-ci s'assemblent en un homodimère p66/p66 puis un clivage par la protéase virale produit l'hétérodimère p66/p51, forme active de la rétrotranscriptase (RT) (Figure 17).



Figure 17 : *Structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1.*

Les domaines structuraux de la sous-unité p66 sont représentés en rouge, bleu, vert jaune et mauve tandis que la sous-unité p51 est colorée en orange.

i. Structure tridimensionnelle

De nombreuses structures cristallographiques ont permis de définir les différents domaines structuraux de la RT (153, 165, 189, 258, 275, 285, 327). Par analogie entre la structure tridimensionnelle de la RT et une main droite (Figure 18), quatre sous domaines des sous-unités de p66 et p51 ont été désignés □ pouce, paume, doigts et connexion (189). La sous-unité p66 contient également le domaine C-terminal RNase H, absent de la sous-unité p51. Bien que les séquences protéiques de p66 et p51 soient identiques, seule la sous-unité p66 porte les activités catalytiques polymérase et RNase H (198). La sous-unité p51 joue un rôle de stabilisation structurale et favorise le contact entre p66 et le complexe amorce/matrice (A/M) (3, 137).

Introduction

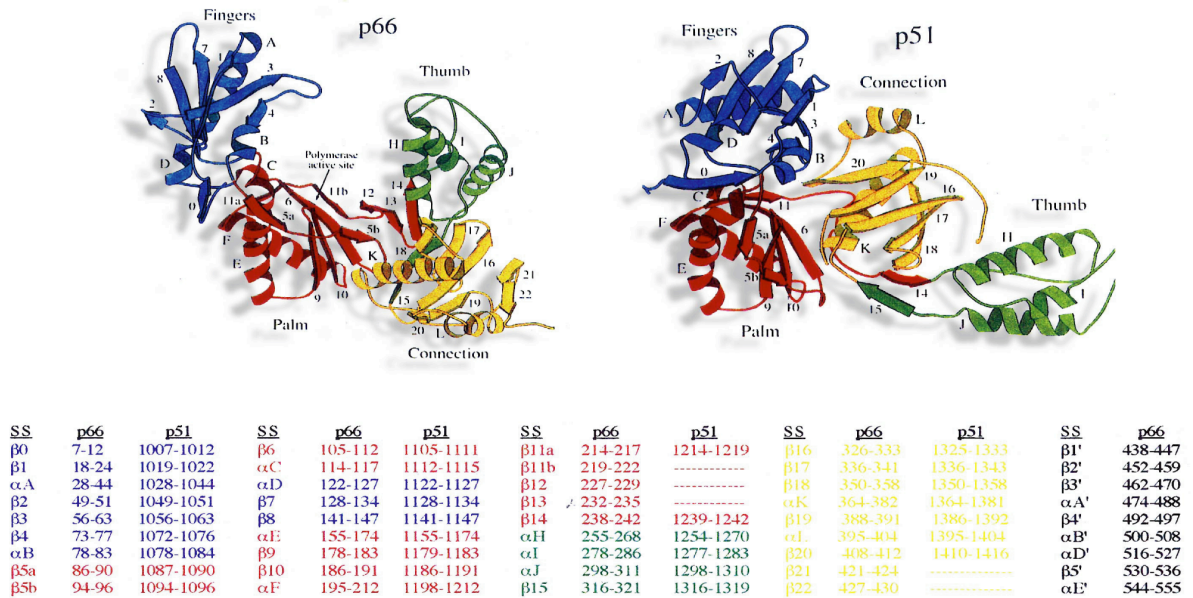


Figure 18 : Structure tridimensionnelle des sous-unités p66 et p51 de la RT du VIH-1.

Les doigts sont représentés en bleu, la paume en rouge, le pouce en vert et le domaine de connexion en jaune. Les hélices \square et les feuillets \square sont indiqués respectivement par des lettres (\square A, \square B...) et des chiffres (\square 0, \square 1...). Le tableau donne la localisation des différents domaines structuraux dans p66 et p51 (d'après (165)).

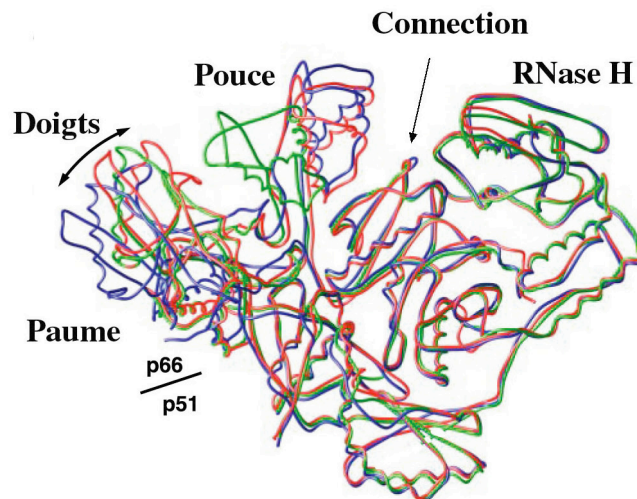


Figure 19 : Superposition des structures cristallographiques de la RT du VIH-1.

Structure de la RT libre (en vert) (275), complexée à un inhibiteur non-nucléosidique, la Névirapine, (en bleu) (285) ou en interaction avec un duplex ADN/ADN : dNTP (en rouge) (d'après (154)).

* La sous-unité p66

- *Les doigts* (aa 1-84 et 120-150) sont impliqués dans le contact avec le brin matrice (26, 165).
- *La paume* (aa 85-119 et 151-244) contient le site catalytique de polymérisation au sein duquel on retrouve la séquence signature YMDD (Tyr 183, Met 184, Asp 185 et Asp 186) conservée chez les rétrotranscriptases (172). Le site catalytique est formé par une triade d'acides aspartiques (Asp 110, 185 et 186) impliquée dans l'interaction avec deux ions Mg^{2+} et la partie 5' triphosphate du dNTP entrant (91, 153, 259). Le motif «Primer grip» (aa 229-232) est impliqué dans le positionnement du complexe A/M.
- *Le pouce* (aa 245-322) intervient dans la fixation du complexe A/M via un motif riche en résidus basiques («Helix clamp») conservé dans beaucoup de polymérases.
- *Le domaine de connexion* (aa 323-437) relie le domaine RNase H au domaine de polymérisation et contient un grand nombre de résidus hydrophobes responsables de la dimérisation de la RT (93, 333).
- *Le domaine RNase H* (aa 438-460) dont la structure se révèle être très proche de celle de la RNase H de *E.coli* et de *T.thermophilus* (72, 147), n'adopte sa conformation active qu'en interaction avec la sous-unité p51 dont le pouce forme le plancher du site catalytique RNase H (165).

* La sous-unité p51

La principale différence structurale entre p66 et p51 se situe au niveau du domaine de connexion qui vient s'intercaler entre la paume et le pouce (165, 189), ce qui empêche le regroupement des aa catalytiques (Asp 110, Asp 185 et Asp 186) ainsi que la création d'une cavité de liaison du substrat. L'hétérodimérisation implique les domaines connexion des deux sous-unités p66 et p51.

ii. Comparaison des structures cristallographiques de la RT (Figure 19)

La comparaison de différentes structures cristallographiques de la RT permet d'observer une flexibilité importante des domaines pouce et doigts de la sous-unité p66 tandis que le domaine paume ne subit que très peu de modifications (153). Dans la RT libre, le pouce de p66 est replié vers la paume, au-dessus du site de polymérisation et entre en contact avec des résidus des doigts (275, 285).

La fixation de la Névirapine, inhibiteur non nucléosidique de la RT, induit un mouvement du pouce qui s'écarte des doigts, ainsi qu'un léger déplacement de l'unité doigts-pouce. Dans le cas d'un complexe catalytique contenant un duplexe ADN/ADN avec un dNTP entrant (154) ou un analogue de nucléotide (Ténofovir) (327), on observe un déplacement des doigts vers la paume. Cette forme de la RT est dite « fermée ». Les changements structuraux se produisant lors de l'étape de polymérisation de la RT pourraient être analogues à ceux d'autres polymérases et feraient intervenir des cycles d'ouverture/ fermeture des doigts la RT (94).

L'ADN double brin complexé à la RT du VIH-1 adopte différentes conformations au sein des 18 paires de base séparant les sites catalytiques polymérase et RNase H (91). Le duplexe présente une conformation de type A, puis une courbure de 41° ni A ni B et enfin une conformation de type B, lorsque l'on se déplace du site polymérase vers le site RNase H (Figure 20). De modestes changements sont observés avec un hybride ADN/ARN (291) où le duplexe adopte une conformation de type H au niveau du site RNase H.

iii. Le site catalytique polymérase

En 1998, la structure de la RT du VIH-1 complexée à un duplexe ADN/ADN dont l'amorce est dépourvue d'une extrémité 3'OH et qui contient un dNTP (dTTP) entrant a été résolue (Figure 21) (153). Les ions Mg^{2+} , distants de 3,57 Å, et qui jouent un rôle fondamental dans la catalyse, ont été mis en évidence. Un premier Mg^{2+} est coordonné par les chaînes latérales des aspartates 110 et 185, par le squelette carbonyle du résidu 111 et par un oxygène libre de chaque phosphate du dNTP entrant. L'autre Mg^{2+} interagit avec l'extrémité 3'OH de l'amorce, les chaînes latérales des aspartates 110, 185 et 186, avec l'oxygène Pro-Rp du phosphate α du dNTP entrant et probablement une molécule d'eau. Ce deuxième Mg^{2+} intervient dans l'activation de l'extrémité 3'OH de l'amorce, ce qui favorise l'attaque nucléophile d'un doublet électronique de cet hydroxyle sur le phosphate α du dNTP entrant. L'autre Mg^{2+} stabilise l'état de transition pentacoordiné du phosphate α , nécessaire à la formation de la liaison phosphodiester entre l'amorce et le dNTP entrant ainsi qu'à la libération du pyrophosphate.

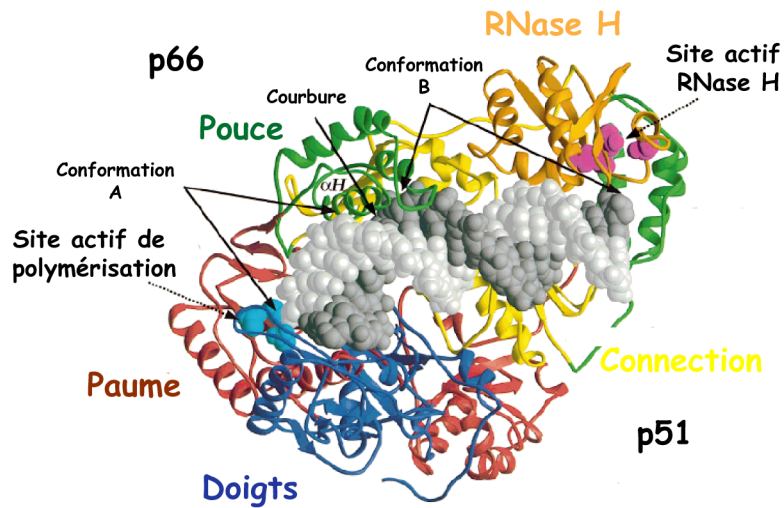


Figure 20 : Structure de la RT du VIH-1 complexée à un duplex A/M (d'après (91)).

A : Le duplex A/M complexé à la RT du VIH-1 avec le site actif de polymérisation à gauche et le domaine RNase H à droite. On peut noter le changement de conformation et la courbure du duplex ADN/ADN. Les domaines pouce, paume, doigts et connection des sous-unité p66 et p51 sont colorés respectivement en vert, rouge, bleu et jaune. Le domaine RNase H de la sous-unité p66 est en orange. La matrice est représentée en gris foncé et l'amorce en gris clair.

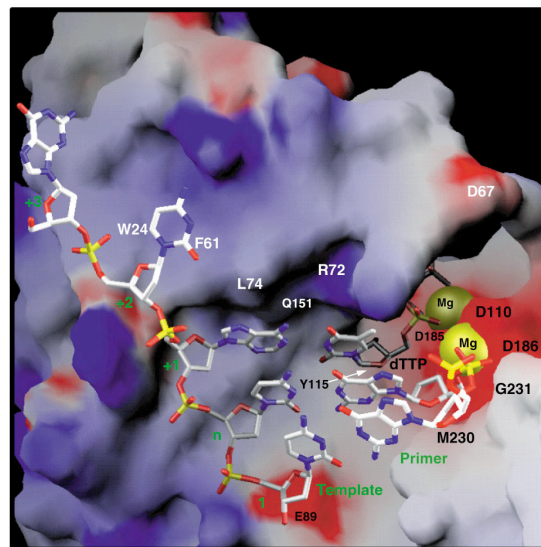


Figure 21 : Structure du site catalytique polymérase de la RT du VIH-1.

Les régions électrostatiquement négatives et positives de la RT sont représentées respectivement en bleu et en rouge. Les ions Mg^{2+} sont représentés par des boules jaunes (d'après (153)).

iv. Le site catalytique et l'activité RNase H

Les cations divalents tels que Mg^{2+} ou Mn^{2+} sont essentiels pour l'activité RNase H du VIH-1 (57). Le nombre d'ions impliqués dans la réaction de coupure reste néanmoins sujet à controverses (188). Deux ions Mn^{2+} distants de 4 Å et coordonnés par les aspartates Asp443, Asp498, Asp549 et par le glutamate Glu478 ont été observés dans le domaine RNase H isolé (72) (Figure 22.A) tandis qu'un seul ion Mg^{2+} lié aux Asp443 et Asp549 a été observé dans le domaine RNase H complexé à un duplexe ADN, en présence du dNTP entrant (153). En outre, la première structure en solution résolue par RMN met en évidence la présence de deux ions Mg^{2+} dans le site actif (257) et un mécanisme de coupure impliquant deux ions Mg^{2+} a été proposé (188). Enfin, les récentes structures de RNase H sauvage et inactives de *B. halodurans* (250), complexées à un hybride ARN/ADN, montrent que les quatre résidus carboxylate du site actif lient deux ions Mg^{2+} séparés de 4,1 à 4,4 Å (Figure 22.B). Un premier Mg^{2+} active une molécule d'eau, nucléophile qui va attaquer la liaison phosphate au niveau du brin ARN, tandis que le second Mg^{2+} stabilise l'état de transition (250).

Deux modes de clivage RNase H ont été décrits (125) : un mode polymérase-dépendant dirigé par l'extrémité 3'OH du brin d'ADN amorce et un mode polymérase-indépendant guidé par l'extrémité 5' de la matrice ARN (Figure 23). Le clivage polymérase-dépendant permet une coupure à 18 nt de l'extrémité 3' de l'amorce (-18 nt), ce qui induit un repositionnement de la RT à environ 10 nt en aval et provoque une seconde coupure de l'ARN (-8 nt). Le clivage polymérase-indépendant conduit aux mêmes types de coupures (Figure 23).

Lors de la réaction de rétrotranscription, le clivage polymérase-dépendant se produit au cours de la synthèse de l'ADN et dégrade l'ARN simultanément à la synthèse du brin d'ADN (-) tandis que le clivage polymérase-indépendant contribuerait à la dégradation de fragments génomiques plus longs, laissés après le premier mode de clivage, ainsi qu'à la formation et à la dégradation de deux fragments d'ARN particuliers, les séquences PPT (PolyPurine Tract). Ces séquences, riches en purine, servent d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+). Le PPT 3' se situe immédiatement en amont de la séquence U3 du LTR 3' tandis que le PPTc (central) est localisé dans le cadre ouvert de lecture du gène *pol* (48) (Figure 6).

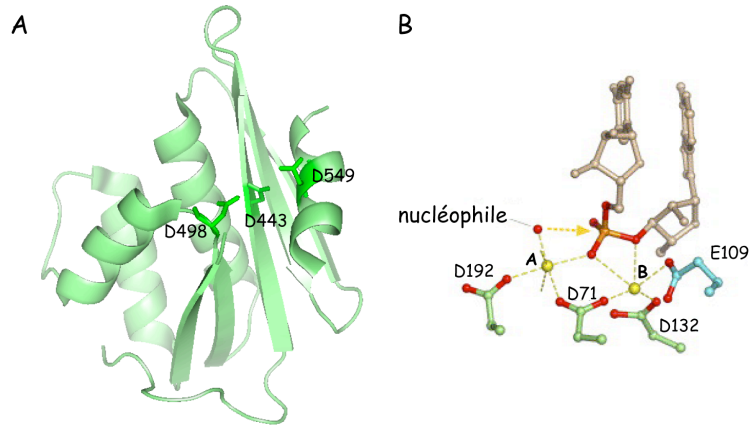


Figure 22 : Structure des sites catalytiques RNase H de la RT du VIH-1 et de *B. halodurans*

A. Représentation du site catalytique RNase H de la RT du VIH-1. Les résidus D443, D498 et D549 sont directement impliqués dans la chélation d'un (153) ou de deux ions Mg^{2+} (72-250), co-facteurs essentiels à la catalyse. **B.** Site catalytique de la RNase H de *B. halodurans* (d'après (248)).

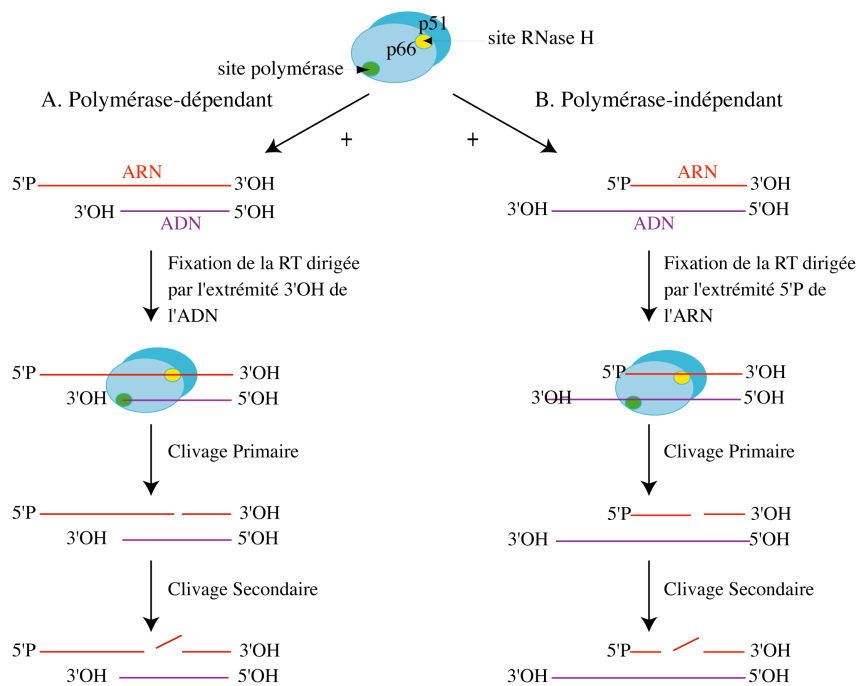


Figure 23 : Schéma illustrant les deux modes de clivage polymerase-dépendant et indépendant par l'activité RNase H de la RT du VIH-1.

(A) Le mode de clivage polymerase-dépendant est dirigé par l'extrémité 3'OH de l'ADN et a lieu durant la polymerisation. Le site de clivage est positionné à l'extrémité 3'OH rentrante du brin ADN, environ 18 nt en amont du site RNase H et détermine la position du clivage primaire de l'ARN (18 nt en aval de l'extrémité 3'OH de l'ADN). Après cette coupure, la RT se repositionne et réalise un second clivage sur l'ARN, environ 8 nt en aval de l'extrémité 3'OH de l'ADN. (B) Le mode de clivage polymerase-indépendant est dirigé par l'extrémité 5'P de l'ARN et aboutit à une coupure primaire suivie d'une coupure secondaire à respectivement 18 et 8 nt en aval de l'extrémité 5'P de l'ARN, selon le même mécanisme que celui décrit précédemment.

b. Mécanisme de polymérisation de la RT (Figure 24)

i. Réaction enzymatique d'incorporation des nucléotides

La synthèse d'ADN par la RT répond à un mécanisme enzymatique de type bi-bi ordonné dans lequel les substrats se fixent à l'enzyme dans un ordre défini, d'abord le complexe A/M puis le dNTP. De même après la polymérisation, le PPi est libéré en premier et le complexe A étendue/M (A_{+1}/M) peut soit se dissocier, soit rester fixé à la RT et servir de substrat à une nouvelle étape de polymérisation. La réaction de polymérisation peut ainsi se décomposer en trois étapes□

- *Une étape de fixation des substrats*□ Le complexe A/M se fixe à l'enzyme libre et induit une lente étape d'isomérisation (92, 192) qui entraîne un mouvement du pouce permettant le positionnement correct de l'extrémité 3' OH de l'amorce au niveau du site actif polymérase (153, 165). La fixation du dNTP se déroule en deux phases□ une fixation non sélective du nucléotide entrant puis son placement correct en face de la base complémentaire de la matrice. Cette dernière phase est l'étape limitante de la catalyse (148, 179) et elle entraîne un changement conformationnel qui pourrait correspondre à la fermeture des doigts, comme c'est le cas pour d'autres polymérases (94).
- *Une étape de catalyse* qui aboutit à la formation de la liaison 3'- 5' phosphodiester entre l'amorce et le dNTP entrant.
- *Une étape de translocation/relarguage des produits*□ Le PPi est relargué et le complexe A_{+1}/M -RT peut ensuite suivre deux voies□ soit la RT se dissocie du complexe A_{+1}/M , soit elle subit une translocation afin de permettre un nouveau cycle catalytique. La translocation se fait en même temps (179) ou juste après (219) le relarguage du PPi. Ce dernier pourrait favoriser l'ouverture des doigts et l'obtention d'un complexe ouvert.

ii. Processivité de la RT

On peut distinguer deux types de réaction de polymérisation de la RT : une polymérisation distributive, lorsque la RT se dissocie du complexe A/M après addition de chaque nucléotide, ou processive, quand la RT incorpore plusieurs nts sans se dissocier de ce complexe. Le rapport k_{pol}/k_{off} détermine le type de polymérisation : une vitesse de polymérisation (k_{pol}) très supérieure à la vitesse de dissociation (k_{off}) traduit une polymérisation processive tandis qu'un rapport k_{pol}/k_{off} inférieur à 1 est représentatif d'un mode de polymérisation distributif. La terminaison forcée induite par la présence d'un seul nt pouvant être incorporé, ou par l'incorporation d'un terminateur de chaîne peut être assimilée à un troisième type de polymérisation. Dans ce cas, la RT ne peut incorporer le nt suivant, même si le k_{pol} est supérieur au k_{off} .

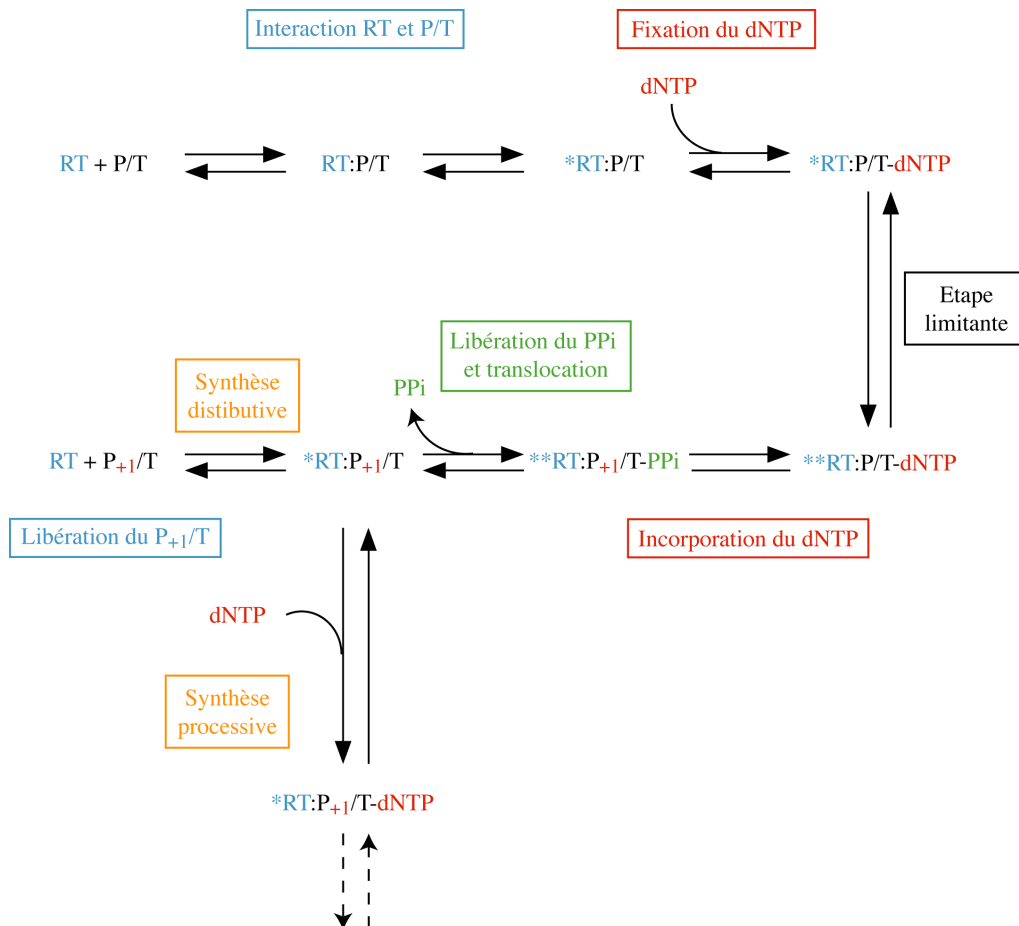


Figure 24 : Schéma des étapes de polymérisation d'un nucléotide par la RT du VIH-1. Les astérisques symbolisent les changements conformationnels liés à la fixation des substrats.

c. La rétrotranscription

i. Complexe d'initiation

Lors du bourgeonnement et de la maturation des virions, l'activité chaperonne de la NC (42, 44, 133, 340) permet l'hybridation spécifique de l'ARNt₃^{Lys} à la région PBS (Primer Binding Site) de l'ARNv (32, 322). Cette région, localisée immédiatement en 3' de la région U5 (Figure 6) comporte une séquence complémentaire aux 18 nt 3' terminaux de l'ARNt₃^{Lys} (Figure 25). L'hybridation *in vivo* serait facilitée par le domaine de connexion de la RT (46).

* Dans certains isolats, dont MAL, qui possèdent une insertion en aval du PBS, la formation du complexe d'initiation s'accompagne de réarrangements structuraux de l'ARNv. De nombreuses interactions additionnelles ARNt₃^{Lys}/ARNv sont requises afin de permettre une initiation efficace de la rétrotranscription. Des études de cartographie en solution et d'empreinte de la RT menées au laboratoire (158, 161) ont permis d'établir des modèles de structure secondaire et tertiaire du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat Mal (Figures 25.A et .B). Outre l'interaction PBS/extrémité 3'_{OH} de l'ARNt₃^{Lys}, une partie de la tige-boucle de l'anticodon et de la boucle variable interagit avec l'ARNv pour former les hélices 6C, 5D et 3E du modèle de structure secondaire. Notre laboratoire a proposé que ces interactions additionnelles conduisent à des réarrangements conformationnels dans l'isolat MAL, ce qui génère les éléments structuraux reconnus par la RT. La combinaison du modèle binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv et de la structure cristallographique de la RT, résolue par Jacobo-Molina et Coll (165), a permis de proposer un modèle tridimensionnel du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv⊠RT (Figure 25.C) (161). Ce modèle suggère que la RT interagit avec les hélices 1, 7F et 8 ainsi qu'avec la jonction entre les hélices 7F et 2 du complexe matrice/amorce. Il a également été utilisé pour déterminer l'importance relative des différents éléments de structure secondaire de l'ARN de l'isolat MAL lors du processus d'initiation (124).

* D'autres structures de complexes d'initiation de différents isolats du VIH-1 ont été proposées (97, 123, 163, 332, 351). Bien que de fortes homologies de séquence soient présentes, ces isolats comportent de nombreuses mutations de part et d'autre de la région PBS. L'hybridation de l'ARNt₃^{Lys} ne modifie que très peu la structure de l'ARNv des isolats NL4-3, HXB2 et Lai et seule l'interaction ARNt₃^{Lys}/PBS semble requise pour

permettre une initiation optimale de la reverse transcription. Notre laboratoire a par conséquent proposé que les interactions additionnelles, présentes dans le cas de l'isolat MAL, ne soient pas requises pour les isolats ne possédant pas d'insertion en aval du PBS, car les motifs reconnus par la RT préexisteraient dans l'ARNv (123).

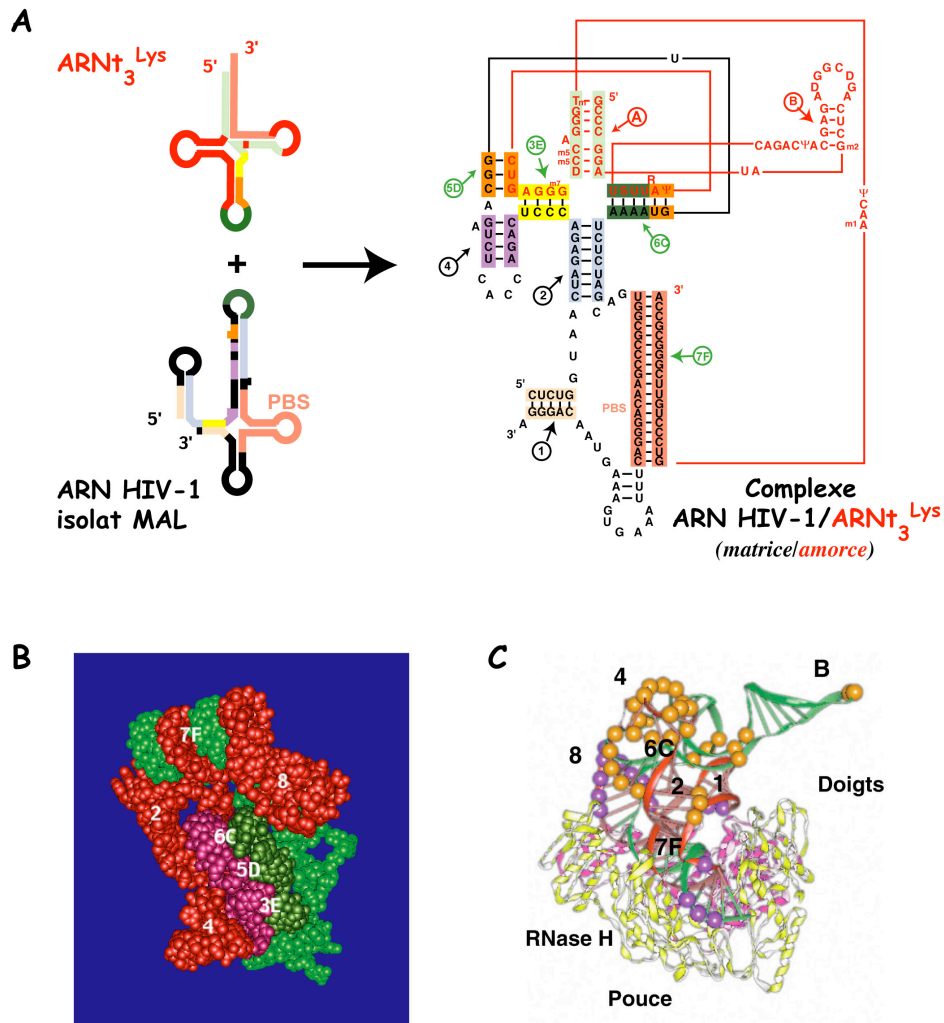


Figure 25 : Modèles de structure secondaire et tertiaire des complexes $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ et $ARNt_3^{Lys}/ARNv : RT$, du complexe d'initiation du VIH-1. (isolat Mal).

A : Interactions dans le complexe binaire $ARNt_3^{Lys}/ARNv$. Les réarrangements intra- et intermoléculaires sont représentés par des couleurs identiques. Les hélices du complexe binaire sont numérotées d'après (158) ; **B :** Modèle 3D du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv$. L' $ARNt_3^{Lys}$ est représenté en rouge et l'ARNv en vert ; **C :** Modèle de structure 3D du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv:RT$. La RT est représentée en jaune (p66) et mauve (p51). Les sphères mauves correspondent aux sites protégés des coupures enzymatiques par les RNases. Les sphères oranges correspondent aux sites de clivage non protégés dans le complexe tertiaire (161).

ii. Synthèse de l'ADN «Strong-Stop» (-)

La synthèse du brin d'ADN (-) démarre à l'extrémité 3'OH de l'ARNt₃^{Lys} et s'arrête à l'extrémité 5' de l'ARNv. Simultanément, l'activité RNase H polymérase-dépendante de la RT dégrade l'ARNv rétrotranscrit. La synthèse de l'ADN «Strong-stop» (-) se décompose en deux étapes : l'initiation et l'élongation. La phase d'initiation de la rétrotranscription correspond à l'addition des six premiers nucléotides à l'ARNt₃^{Lys} et requiert la formation du complexe ternaire homologue ARNt₃^{Lys}/ARNv/RT pour être efficace (160, 194, 195). Il s'agit d'une phase distributive et spécifique contrairement à l'étape d'élongation qui est processive et non spécifique. Une augmentation brutale du k_{pol} se produit lors de l'addition du septième nucléotide et l'affinité de la RT pour le complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv augmente après l'addition d'environ 17 nt. La synthèse d'ADN «Strong-stop» (-) en présence du complexe d'initiation ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat Hxb2 peut également se décomposer en une phase distributive suivie d'une phase processive (8).

Une fois l'ADN «Strong-stop» (-) synthétisé, l'activité RNase H polymérase-indépendante détruit les fragments d'ARN encore hybridés à l'ADN. La dégradation complète de ces fragments est requise pour permettre le premier transfert de brin.

iii. Le premier transfert de brin

La présence de séquences répétées R aux deux extrémités de l'ARNv permet le premier transfert de brin par hybridation de l'ADN «Strong-stop» (-) à l'extrémité 3' du génome (Figure 26). En raison de la nature dimérique du génome viral, le premier transfert de brin peut être intra ou intermoléculaire (152, 329). Des modes de transfert de brin intra et intermoléculaires en proportion équivalente (329) ou exclusivement intermoléculaires (256) ont été proposés mais restent sujets à controverse.

Un mécanisme de transfert de brin par invasion du brin accepteur (52, 53), c'est-à-dire de la séquence R en 3' de l'ARNv, semble être de plus en plus probable.

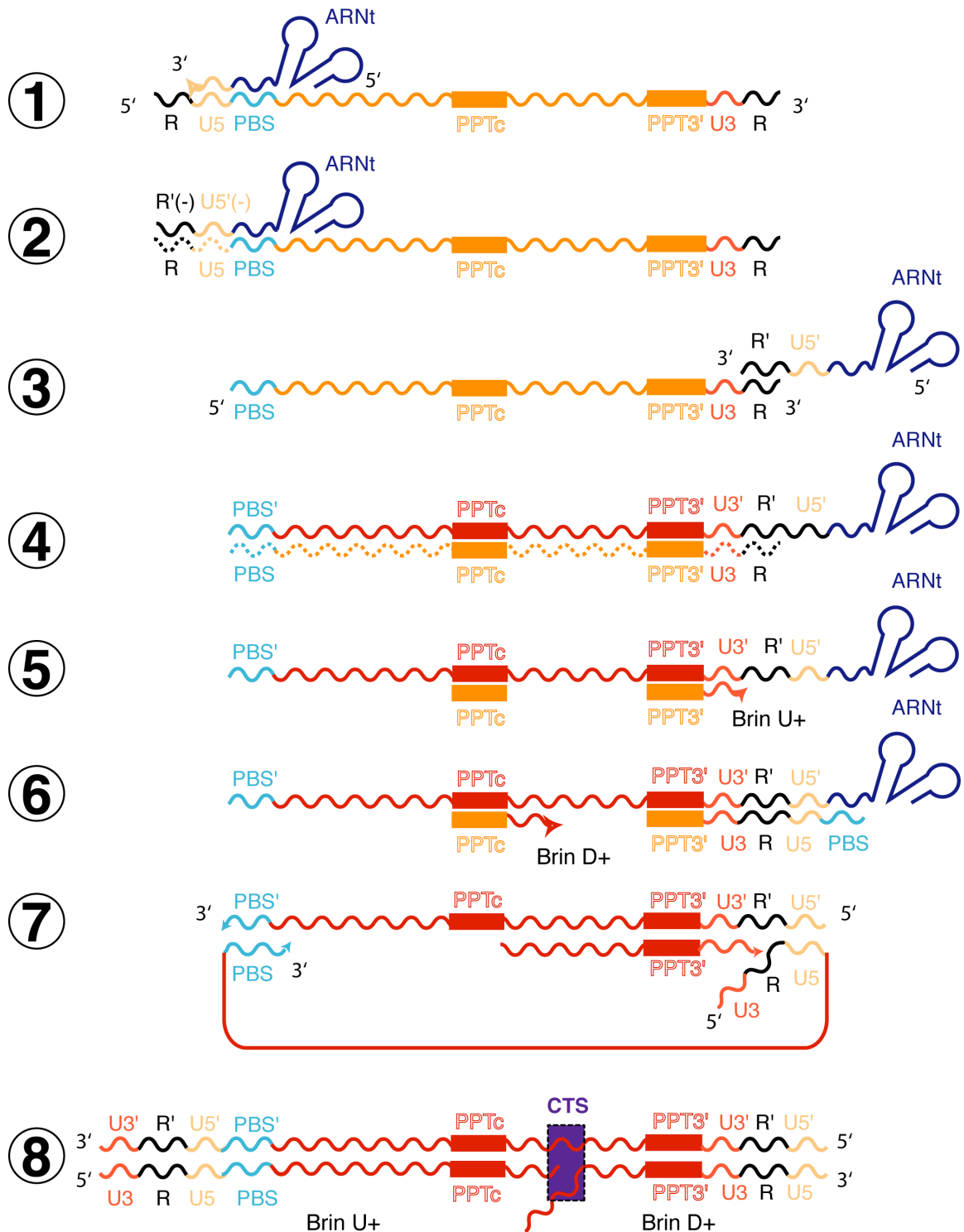


Figure 26 : La rétrotranscription de l'ARN génomique du VIH-1.

1 : Initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) ; 2 : Synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (-) et dégradation de l'ARN matrice par l'activité RNase H ; 3 : Saut du brin d'ADN "Strong-Stop" (-) ; 4 : Fin de la synthèse du brin d'ADN (-) et dégradation de la matrice par l'activité RNase H ; 5 : Initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPT3' ; 6 : Synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (+) et initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPTc ; 7 : Dégradation des amorces ARN et ARNt et saut de brin de l'ADN "Strong-Stop" (+) ; 8 : Terminaison de la synthèse des deux brins d'ADN et synthèse d'un "DNA flap" au niveau du CTS.

Lors de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-), la RT s'arrêterait transitoirement à la base de la boucle TAR, ce qui induirait le clivage de l'ARNv donneur et l'exposition de région d'ADNc. Le brin ARNv accepteur pourrait alors interagir avec l'ADN «strong-stop» (-). Lors de la reprise de l'extension de cet ADN, l'hybride ADNc/ARNv accepteur se propagerait jusqu'à ce que l'ADN «strong-stop» (-) soit entièrement synthétisé. La NC joue un rôle important dans ce processus : elle promeut l'hybridation des brins complémentaires ADNc/ARNv accepteur et déplace les fragments donneurs fragmentés. La NC inhibe également le repliement sur lui-même de l'ADN «strong-stop» (-) (141), en particulier la boucle ADN complémentaire à TAR (15, 16), ainsi que «self-priming» de l'ADN «strong-stop» (-) (15, 141).

iv. La synthèse du brin d'ADN (-)

Le premier transfert de brin permet à la synthèse du brin (-) de se poursuivre jusqu'au PBS. Au cours de cette synthèse, l'ARN viral est dégradé par l'activité RNase H de la RT à l'exception des deux séquences PPT.

v. L'initiation de la synthèse du brin (+)

Les séquences riches en purine et identiques PPT3' et PPTc permettent d'initier la synthèse du brin d'ADN (+) via l'activité ADN polymérase ADN dépendante de la RT. Le PPT3' et le PPTc produisent respectivement le brin U (+) ou ADN «strong-stop» (+) et le brin D (+). La coupure en 3' du PPT doit être très précise car elle définit l'extrémité gauche de l'ADN linéaire qui servira de site de reconnaissance et de clivage par l'intégrase virale.

vi. Le second transfert de brin

La synthèse de l'ADN «strong-stop» (+) se poursuit en utilisant le brin ADN (-) comme matrice et se termine après rétrotranscription d'une partie de l'ARNt₃^{Lys} encore attaché à l'ADN (-). La méthylation de l'A₅₈ de l'ARNt₃^{Lys} permet l'arrêt de la rétrotranscription lorsque les 18 nt 3'-terminaux (PBS (+)) sont copiés (10, 37, 276). L'obtention de produits trop longs empêche la poursuite de la synthèse après le second transfert de brin. L'activité RNase H permet ensuite la dégradation de l'ARNt₃^{Lys} en le clivant entre les ribonucléotides A et C de l'extrémité 3' CCA (343), l'adénine restant liée à l'ADN (308). La région PBS (+) devient alors accessible et s'hybride, probablement avec l'aide de la NC (99), à la région PBS (-) complémentaire, ce qui constitue le second saut de brin.

Parallèlement, les amorces ARN PPT sont dégradées. L'activité RNase H de la RT est également primordiale dans le second transfert de brin puisqu'un mutant RNase H (-) incapable de dégrader l'ARNt₃^{Lys} induit une diminution considérable de l'efficacité du transfert (10).

vii. La terminaison de la rétrotranscription

Le brin d'ADN (-) ainsi que l'extrémité 5' du brin U (+) servent respectivement de matrice pour compléter la synthèse du brin ADN (+) (U (+) et D (+)) et du brin d'ADN (-). La synthèse du brin U (+) se termine au niveau d'une séquence CTS (Séquence de Terminaison Centrale) riche en AT et localisée au centre du génome. Toutefois le brin U (+) déplace le brin D (+) sur une centaine de nucléotides induisant la formation d'un «DNA flap». Ce recouvrement intermédiaire triple brin semble être important pour l'import nucléaire de l'ADN proviral (6, 348).

d. Les protéines additionnelles impliquées dans le processus de rétrotranscription

- *L'intégrase IN* Une interaction directe entre le domaine C-terminal de l'IN et la RT a été mise en évidence *in vitro* (319, 345). Une cystéine présente au niveau du «Core» de l'IN joue un rôle essentiel dans l'initiation de la rétrotranscription et sa mutation conduit à l'obtention d'un virus non infectieux (145), bien que l'activité catalytique de l'IN ne soit pas modifiée. Ce virus présentant une déficience dans la production de produits précoces de rétrotranscription, il a été proposé que la mutation pourrait perturber l'interface d'interaction essentielle entre la RT et l'IN (353).
- *La protéine de nucléocapside NCp7* Outre son implication dans l'encapsidation des ARNv, dans l'hybridation de l'ARNt₃^{Lys} au PBS (32, 322, 323) et dans les processus de saut de brin, la NC déstabilise également les structures secondaires en amont du site de polymérisation (15, 16, 141), ce qui conduit à une progression plus rapide de la RT le long de la matrice (95, 344) ainsi qu'à une diminution des pauses lors de l'initiation de la rétrotranscription (205). Il a également été proposé que les propriétés histone-like de la NC, induisant la condensation de l'ADN, contribue à la stabilité de l'ADN viral *in vivo* (191).
- *La protéine virale Vpr* Permet de diminuer d'un facteur quatre le taux de mutations au cours de la rétrotranscription via le recrutement, lors de l'encapsidation, de l'uracile ADN glycosylase, une protéine impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN (51, 216).

- *La protéine Nef* peut interagir *in vitro* avec la RT et augmenter son affinité pour l'ARNv sans pour autant modifier son activité catalytique (113). Par conséquent la RT se dissocierait moins vite du complexe de rétrotranscription, ce qui augmenterait la synthèse de l'ADN viral. Parallèlement, il a été montré que des virus Nef-déficients synthétisent cinq à dix fois moins d'ADN viral que le virus sauvage (173, 296).
- *La protéine Vif* empêche l'encapsidation de deux cytidines déaminases, APOBEC3G (221, 302) et APOBEC3F (336) impliquées dans l'hypermutation de l'ADNv néosynthétisé. Leur absence dans le virion évite la production de protéines virales inactives, ainsi que la dégradation de l'ADNv (215, 336, 349, 352). Par ailleurs, Vif se lie à l'ARN et pourrait interagir avec le complexe ARNv/ARNt₃^{Lys} et jouer un rôle dans l'initiation de la rétrotranscription (86).
- *La protéine Tat* Diverses études ont montré que des virus Tat-déficients étaient incapables d'initier efficacement la rétrotranscription (136) et que Tat faciliterait l'hybridation de l'ARNt₃^{Lys} à l'ARNv. D'autre part, Tat empêcherait la synthèse de produits prématures de rétrotranscription dans le cytoplasme durant la phase tardive du cycle répliatif (175).
- *La cyclophiline A* Indispensable à l'infectivité virale, elle est impliquée dans le désassemblage du «*core*» viral suite à l'entrée du virus. Son absence conduit à une synthèse réduite d'ADN lors de la rétrotranscription (28).
- *La topoisomérase I* agit sur la processivité de la RT (316-318) et augmente le taux d'ADN viral synthétisé.

4. Le transport intranucléaire de l'ADN proviral

L'ADN proviral est importé dans le noyau sous la forme d'un complexe de pré-intégration (PIC) contenant l'ADN proviral condensé, l'IN, la MA, Vpr, la RT ainsi que la protéine cellulaire HMG-I(Y) (106, 237). Contrairement à la plupart des lentivirus qui réalisent l'intégration de leur génome dans l'ADN cellulaire lorsque la membrane nucléaire est absente, le complexe de pré-intégration du VIH-1 peut entrer dans le noyau des cellules cibles pendant l'interphase (180). HIV-1 est de ce fait capable d'infecter les cellules différenciées ne se divisant plus, dont les macrophages (35).

Il n'existe pas aujourd'hui de consensus quant au contrôle de cette étape critique par les protéines virales et cellulaires (35, 265).

Toutefois, plusieurs facteurs viraux semblent réguler l'import nucléaire. Le «Central DNA flap» agirait en *cis* comme déterminant de l'import nucléaire (348) ou élément facilitant celui-ci (6). Les protéines de MA, contenant 2 NLS, médieraient l'import nucléaire du PIC (36, 134). D'autres NLS ont également été trouvés dans l'IN (25) et Vpr (36, 169) et faciliteraient l'import nucléaire du PIC.

5. L'intégration de l'ADN proviral

a. L'intégrase

i. Structure tridimensionnelle (Figure 27)

Sur la base d'études fonctionnelles et structurales, l'IN a été décomposée en trois domaines distincts (50, 55, 105, 121, 212, 334)

- Le domaine N-terminal (aa 1-51) est composé de trois hélices α interagissant entre-elles via la coordination d'un atome de zinc par des histidines et cystéines conservées (doigt de zinc impliquant un motif HHCC). Le domaine Nt serait également impliqué dans la multimérisation de l'IN.
- Le domaine central (aa 52-210) ou «core» catalytique contient le motif DDE (D64, D116 et E152) conservé entre autres dans toutes les intégrases codées par les rétrovirus et les rétrotransposons. Par analogie avec les ADN polymérases, il est proposé que cette triade de résidus acides coordine les métaux divalents dont le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} , cofacteurs essentiels à la catalyse (100, 193).
- Le domaine C-terminal (aa 220-288) contribue à la liaison non spécifique de l'ADN via un domaine SH3 (50) et est impliqué dans le processus de multimérisation de l'IN (168).

En raison de la nécessité d'intégrer simultanément les deux extrémités de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, les processus de maturation des extrémités de l'ADN proviral ainsi que d'intégration nécessite théoriquement deux sites catalytiques. Toutefois, les données biochimiques et structurales suggèrent que la forme active de l'IN est un tétramère (21, 109, 168), où plutôt un dimère de dimère dans lequel seuls deux sites catalytiques seraient actifs (334). Une structure composite de l'IN complète, sous forme tétramérique, a été obtenue par superposition des domaines Nt-core (334) et core-Ct (50).

La compréhension du mécanisme d'intégration a longtemps été rendue difficile par l'absence d'un système *in vitro* d'intégration concerté, capable de réaliser l'intégration complète des deux extrémités de l'ADN proviral dans un ADN cible, par opposition à une intégration à un seul site. Plusieurs groupes ont récemment réussi à mettre au point un tel système (204, 303). Ils ont également montré que l'extrémité sortante de 2 nt, générée par l'activité de processing en 3' de l'IN (cf. paragraphe suivant et figure 28) et que le domaine C-terminal de l'IN sont importants pour la réalisation d'une intégration concertée par rapport à une intégration à un seul site (204). De plus, l'IN recombinante est capable de réaliser l'intégration complète de l'ADN viral *in vitro*, sans facteurs additionnels et avec une efficacité proche du PIC purifié à partir de cellules infectées (303). Enfin, des expériences de pontage de différentes formes d'oligomères d'IN recombinantes ont suggéré que le complexe minimal d'intégration, capable de réaliser l'intégration concertée des deux LTRs dans l'ADN cible, est constitué d'un tétramère d'IN lié aux extrémités de l'ADN viral (109).

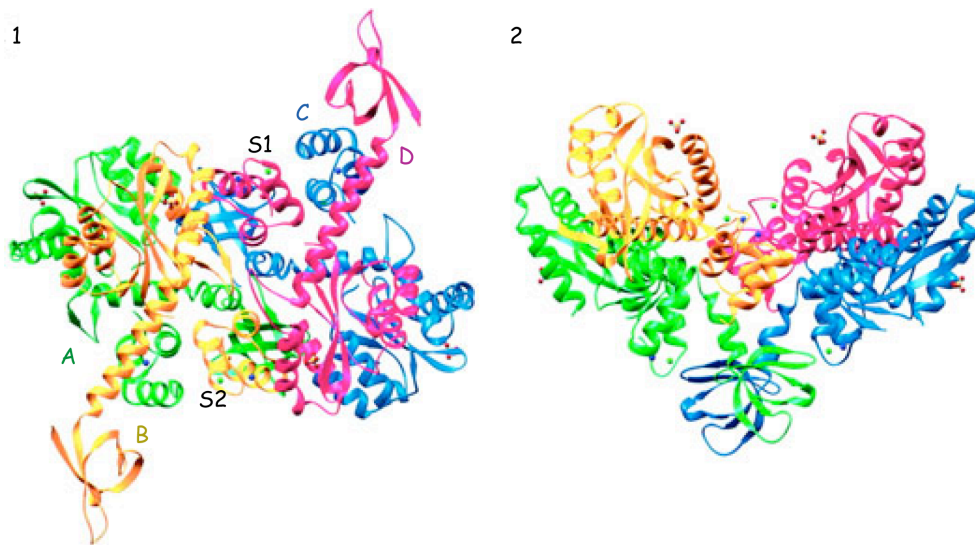


Figure 27 : Structure composite d'un tétramère d'IN du VIH-1 (d'après (334)).

Vues orthogonales de la structure du tétramère d'intégrase du VIH-1. 1: Les quatre monomères A, B, C et D ne sont pas équivalents, seuls B et D participent à la formation des sites catalytiques actifs (S1 et S2). 2 : vue orthogonale en forme "de coeur".

ii. Activités catalytiques

L'intégrase permet l'intégration de l'ADN proviral double brin dans l'ADN de la cellule cible. Pour cela, deux activités catalytiques réalisées par le même site actif sont requises : une activité de clivage de l'extrémité 3' de l'ADN ou «3'-end processing» et une activité de transfert de brin (55, 105). Ces deux réactions sont des transestérifications en une étape (101) qui nécessitent la présence de cations divalents (34, 199) dont la nature et le nombre restent controversés (130). Certaines études structurales indiquent la présence d'un seul ion Mg^{2+} ou Mn^{2+} (121, 212) tandis que deux ions Cd^{2+} ou Zn^{2+} séparés de 3,6-3,7 Å ont également été observés (34, 50, 341). Un second ion Mg^{2+} pourrait être apporté au niveau du site actif par le substrat (206). Les réactions catalysées par l'IN sont ordonnées, d'abord le 3'-end processing puis le transfert de brin.

b. Mécanisme d'intégration (Figure 28)

Les extrémités 3' de l'ADN proviral contiennent un tétranucléotide conservé CAGT, essentiel à l'intégration dans le génome de la cellule hôte. Dans un premier temps l'IN reconnaît spécifiquement ces extrémités et enlève le dinucléotide GT, ce qui libère une extrémité $CA\text{-}3'\text{-OH}$ récessive sur chaque brin. Lors de la seconde étape, les groupements hydroxyles de ces extrémités vont réaliser une attaque nucléophile sur les deux brins de l'ADN cible, au niveau de liaisons phosphodiester distantes de cinq nucléotides. Il en résultera l'apparition de séquences répétées directes de 5 nt encadrant le provirus intégré.

Le processus d'intégration est probablement achevé par des enzymes cellulaires permettant l'enlèvement des dinucléotides non appariés à l'extrémité 5' du génome viral, le remplissage de la zone ADN simple brin puis la ligation de ces extrémités. Les sites d'intégration de l'ADN proviral sont multiples et la plupart des cellules infectées possèdent plus d'un provirus intégré (174). Les sites d'intégration ne sont pas distribués de façon aléatoire, mais sont enrichis dans les gènes dont la transcription est active, particulièrement dans les gènes activés suite à l'infection par HIV, et dans des sites préférentiels d'intégration («Hot spots») (294). Cependant, un haut niveau de transcription peut inhiber le processus d'intégration dans les gènes transcrits (229).

L'analyse des sites d'intégration met en évidence une séquence d'intégration privilégiée [-3]TDG(intégration)GTWACCCHA[7] (D = G, A ou T, W = A ou T et H = A, T ou C) dans laquelle aucune base n'est absolument requise, ni interdite (144). Ainsi, l'absence d'une séquence consensus absolue suggère que ce sont les mécanismes de ciblage plutôt que la reconnaissance d'une séquence primaire qui sont impliqués dans la sélection du site d'intégration (144).

L'intégration dans le génome de la cellule hôte reste néanmoins une étape très complexe si bien que dans 99% des cas, l'ADN proviral reste sous forme linéaire et est dégradé ou se circularise et forme des structures à 1 ou 2 LTR (56). *In vitro*, les étapes de processing et de transfert de brin peuvent être réalisées par l'IN seule (181, 303). Toutefois et bien que leur rôle soit inconnu, les protéines HMG-I(Y) impliquée dans le remodelage de la chromatine et BAF (Barrier to autointegration) (49) sont requises pour une intégration efficace *in vivo*.

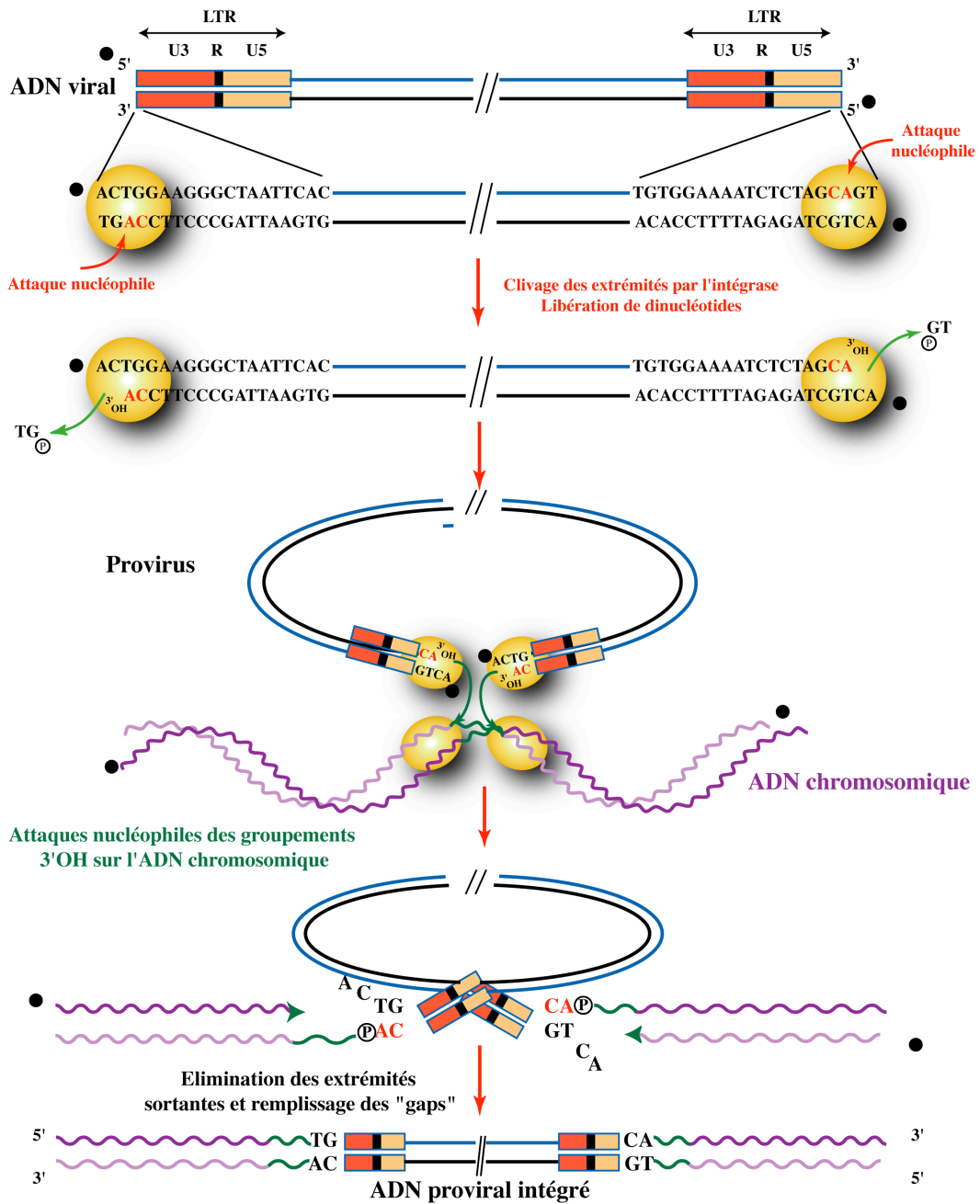


Figure 28 : *Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.*

Les extrémités franches de l'ADN proviral, très conservées, sont reconnues et clivées par l'intégrase. Le dinucléotide GT est libéré, ce qui génère une extrémité rentrante 3'OH. L'intégrase clive l'ADN de l'hôte et les extrémités 3'OH de l'ADN proviral sont liguées aux extrémités 5' phosphate de l'ADN hôte par l'intégrase. Après élimination des extrémités sortantes, les discontinuités générées au niveau des sites de ligation sont réparées par les enzymes cellulaires. Les extrémités 5' sont représentées par des sphères noires.

Chapitre II: L'inhibition du VIH-1

Les traitements antiviraux actuellement disponibles combinent des inhibiteurs de la rétrotranscriptase (NNRTI et NRTI) ainsi que des inhibiteurs de la protéase (PI). Ils peuvent être associés à un inhibiteur de la fusion des membranes virale et cellulaire qui se produit lors de l'infection virale. Cependant, des mutations de résistance apparaissent rapidement et il est nécessaire de trouver des stratégies d'inhibition complémentaires comme la vaccination (<http://vaxgen.com>, <http://pasteur.fr>, <http://anrs.fr>) et/ou l'utilisation préventive de microbicides. De nombreuses molécules ciblant d'autres étapes du cycle réplcatif sont également en cours de développement. Il s'agit d'inhibiteurs de l'intégrase virale, d'antagonistes des corécepteurs viraux, d'agents éjecteurs des ions Zn^{2+} présents au niveau des doigts de zinc de la NC, ou encore d'inhibiteurs de la transactivation de la transcription virale (75).

I. L'apparition de virus résistants

A. Liée au manque de fidélité de la rétrotranscriptase

La fidélité d'une ADN polymérase est mesurée par le nombre de nucléotides consécutifs pouvant être incorporés dans une chaîne d'ADN tout en respectant les appariements Watson-Crick usuels. Un élément essentiel à la fidélité d'une polymérase est sa capacité à éliminer les mésappariements lorsqu'ils se produisent. Cette opération nécessite une activité 3'exonucléasique, dite de «proofreading» ou de correction, qui n'est présente que chez certaines polymérases (14).

Dans le cas du VIH-1, la fréquence d'incorporation d'un nucléotide mal apparié est estimée à environ 1 base sur 4000 à 1 base sur 7000 (217, 268, 282). Cependant, la faible fidélité de la RT du VIH-1 ne peut être expliquée uniquement par l'absence d'activité proofreading, car d'autres RT dépourvues de cette activité 3'exonucléasique présentent une fidélité 10 à 18 fois supérieure (283). La RT du VIH-1 est capable de poursuivre la synthèse d'ADN au-delà des mésappariements (282).

Sa faible fidélité présente à la fois un inconvénient, car elle permet l'émergence rapide de virus résistants aux inhibiteurs mais également un avantage lors du traitement antiviral par des NRTI, puisqu'elle assure l'incorporation de ces nucléotides non naturels.

B. Liée à la recombinaison

La nature dimérique du génome viral et le fait que la co-infection par des souches différentes du VIH-1 se produise fréquemment chez les personnes infectées (174) est à l'origine d'une importante variabilité génétique (277). La recombinaison se produit par transfert ou déplacement de brin (248), lorsque la RT utilise alternativement les deux molécules d'ARN comme matrice. L'ADN proviral hybride généré par cette recombinaison peut être à l'origine de l'apparition de virus multirésistants si les virus infectant la cellule portent des mutations de résistance différentes (243).

La faible fidélité de la RT du VIH-1 ainsi que l'existence d'un mécanisme de recombinaison sont ainsi à l'origine de l'apparition rapide de mutations de résistances, en particulier pour les inhibiteurs utilisés lors des traitements antiviraux. Des mutations de résistances spécifiques peuvent être associées à chaque inhibiteur, dans le gène codant pour la RT, la PR ou le domaine HR1 de gp41, lors de l'utilisation respective d'inhibiteurs de RT, d'inhibiteurs de PR ou de l'inhibiteur de fusion T-20 (75). L'utilisation de ces inhibiteurs, en concentrations sous-optimales, autorise une faible réplication virale et sélectionne les virus porteurs de mutations qui offrent un avantage répliatif. Ces virus, plus aptes à se répliquer en présence des inhibiteurs, vont progressivement former une population dominante par rapport au virus sauvage.

II. Les différentes stratégies d'inhibition

A. Stratégies utilisées en polythérapies

1. Les inhibiteurs analogues de nucléosides (NRTIs) (Figure 29)

i. Structure des molécules et mode d'action

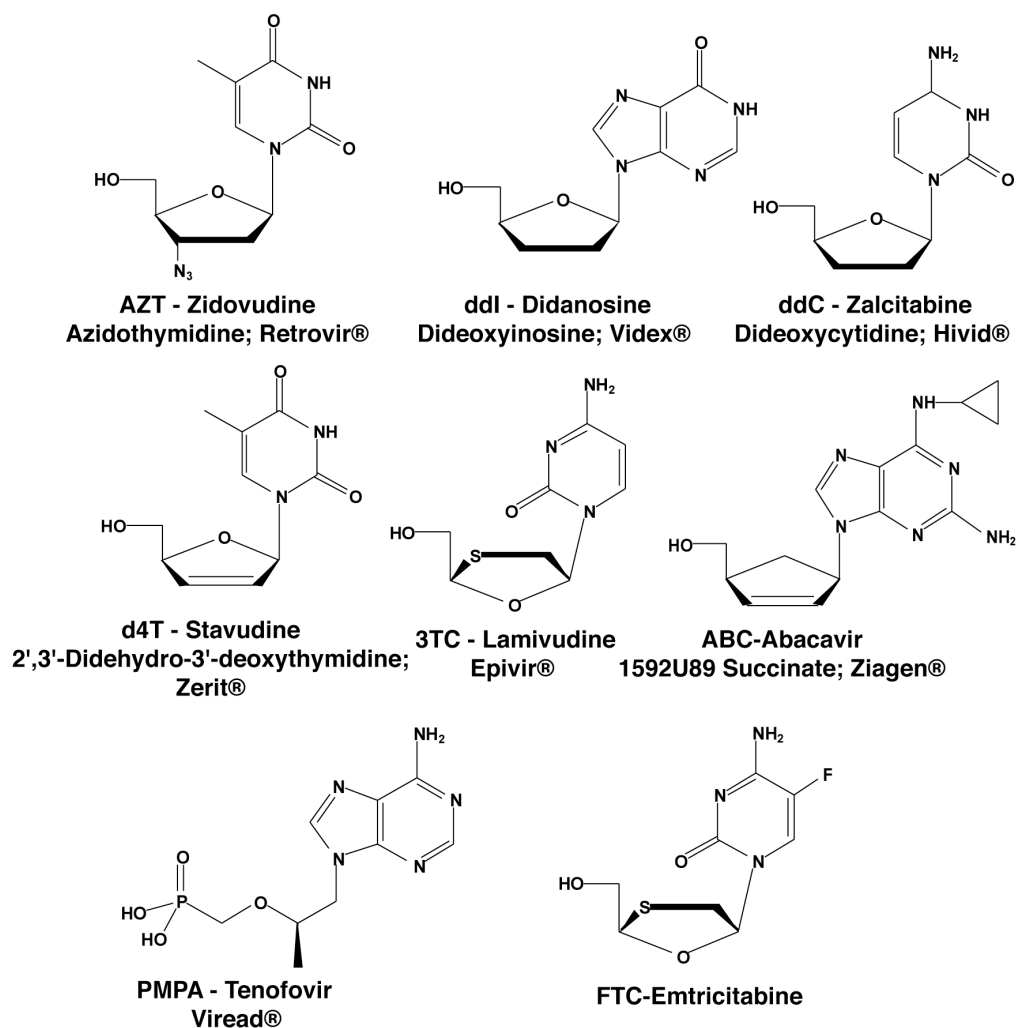


Figure 29 : Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la rétrotranscriptase du VIH-1.

L'AZT (Zidovudine), un analogue de la thymidine comportant un groupe azido au lieu d'un groupement hydroxyle en position 3' du ribose (Figure 29), a été la première molécule anti-VIH approuvée par la Food and Drug Administration (FDA, <http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/fdadrug.htm>) en 1987. D'autres analogues de nucléosides (Figure 29) ont suivi ; les dideoxynucléotides ddI (didanosine) et ddC (zalcitabine), les composés avec une double liaison entre les positions 2' et 3' du dideoxyribose, d4T (stavudine) et ABC (abacavir) et les molécules comportant un groupement β -L-oxathiolane à la place du groupement ribose, 3TC (Lamivudine) et FTC (emtricitabine). Le PMPA (ténofovir) présente une structure un peu particulière puisqu'il est dépourvu de ribose. Il a été approuvé par la FDA pour une utilisation clinique en octobre 2001.

Les NRTIs sont administrés sous forme de pro-drogues non-phosphorylées, à l'exception du ténofovir qui est monophosphorylé et qui est le seul analogue de nucléotide anti-VIH commercialisé. Une fois à l'intérieur des cellules, les NRTIs sont phosphorylés en nucléotides tri-phosphates par des kinases cellulaires (Figure 30). En outre, le ddI et l'ABC doivent subir une étape d'activation cellulaire afin d'être respectivement transformés en ddAMP (171) et en carbovir monophosphate (CBVMP) (271). La première étape de phosphorylation est généralement limitante, excepté dans le cas de l'AZT où l'étape de phosphorylation du nucléoside monophosphate est la plus lente (196, 197).

Les NRTIs modifiés se fixent ensuite au site actif polymérase où ils entrent en compétition avec les dNTPs naturels pour l'incorporation dans la chaîne d'ADN naissante. L'absence de groupement 3' hydroxyle sur le ribose empêche la formation d'une liaison phosphodiester 3'-5' avec le phosphate \square du nucléotide suivant, ce qui conduit à l'arrêt de la synthèse d'ADN. Les NRTIs agissent par conséquent comme terminateurs de chaîne (Figure 30).

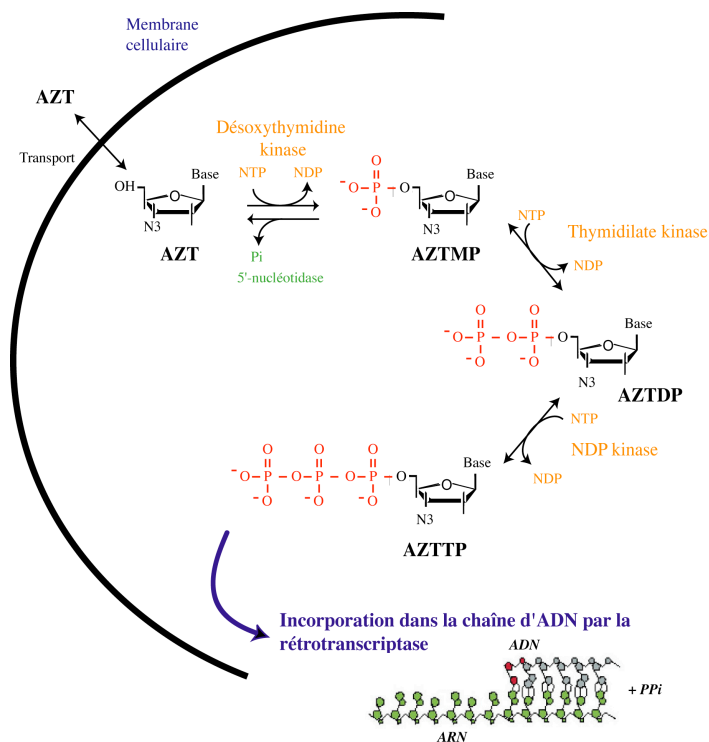


Figure 30 : Phosphorylation et incorporation : cas de l'AZT.

Après la phosphorylation par des kinases cellulaires, l'AZT est incorporé dans la chaîne d'ADN par la rétrotranscriptase. L'absence de groupement 3'OH, sur le ribose de l'AZT incorporé, empêche l'addition du nucléotide suivant.

ii. La résistance aux NRTIs

Des substitutions de bases dans le gène codant pour la RT sont rapidement sélectionnées chez les patients traités par des NRTIs. Elles sont associées à une résistance accrue au NRTI administré. Le tableau 1 répertorie les mutations les plus fréquemment retrouvées dans la RT pour les NRTIs utilisés en thérapie. Une mutation observée suite à un traitement par un NRTI peut conférer une résistance croisée à un autre NRTI. C'est le cas par exemple de la mutation L74V qui apparaît lors d'un traitement avec le ddI (310) et qui confère également une résistance de 2 à 5 fois au ddC. En revanche, certaines mutations peuvent resensibiliser un virus mutant à un autre NRTI. À titre d'exemple, en présence des 6 mutations associées aux analogues de thymidine (TAMs) (Tableau 1), la mutation M184V obtenue lors d'une monothérapie avec le 3TC resensibilise la RT mutante à l'AZT, au d4T et au PMPA (127, 238).

Les mutations de résistance aux divers NRTIs ont été localisées (Figure 31) grâce à la structure cristallographique de la RT complexée à un duplex ADN/ADN, en présence d'un dNTP. Les résistances aux didéoxynucléotides (3TC, ddC, \square .) impliquent des substitutions d'acides aminés se situant à l'avant du site de fixation des dNTP tandis que les mutations qui confèrent une résistance à l'AZT sont localisées à l'arrière de la cette poche de fixation (153).

Deux mécanismes permettent d'expliquer les résistances liées aux NRTIs, un mécanisme de discrimination et un mécanisme d'excision du NRTI.

➤ *Le mécanisme de discrimination de l'analogue de nucléotide* (Figure 32)

De nombreuses études *in vitro* utilisant des RT recombinantes montrent que les mutations M184V (110, 190), K65R (305) et L74V (225) sont associées à une diminution de l'incorporation des NRTIs auxquels elles confèrent une résistance en culture cellulaire ou *in vivo*. L'augmentation de la discrimination à l'encontre des NRTIs impliqués peut être la conséquence d'une baisse de la fixation du NRTI à la RT et/ou d'une moins bonne incorporation dans l'ADN en voie de synthèse. La mutation M184V semble augmenter la discrimination du 3TC ou du FTC en diminuant l'affinité de ces molécules pour l'enzyme mutante (110), tandis que la mutation K65R réduit la vitesse d'incorporation du ddI et du ddC (299).

Introduction

NRTI	Position des résidus mutés de la RT du VIH-1											
	41	65	67	69 + insertion	70	74	75	151	184	210	215	219
AZT	M41L	★	D67N	T69D	K70R	★	V75T	Q151M	★	L210W	T215F	K219Q
d4T	M41L	K65R	D67N	T69D	K70R		V75T	Q151M	★	L210W	T215F	K219Q
TDF	M41L	K65R	D67N	T69D			V75T	Q151M	★	L210W	T215F	K219Q
ABC	M41L	K65R	D67N	T69D		L74V	V75T	Q151M	M184V	L210W	T215F	K219Q
ddI	M41L	K65R	D67N	T69D		L74V	V75T	Q151M	M184V	L210W	T215F	K219Q
ddC	M41L	K65R	D67N	T69D	K70R	L74V	V75T	Q151M	M184V	L210W	T215F	K219Q
3TC	M41L	K65R		T69D	K70R			Q151M	M184V	L210W	T215F	
FTC	M41L	K65R		T69D			V75T	Q151M	M184V	L210W	T215F	

 Forte résistance	 Pas de résistance
 Résistance intermédiaire	★ Rend la RT hypersensible au NRTI
 Faible résistance	X000X Principales mutations associées à la résistance au NRTI
 Contribue à la résistance	X000X Mutations moins fréquentes

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principales mutations de résistance associées à chacun des NRTIs utilisés en thérapie.

Dans le cas de l'AZT, deux des principales mutations ou plus sont nécessaires au phénotype de résistance. La mutation Q151M est présente chez des patients infectés par des virus résistant à plusieurs NRTI (résistances multiples). Une mutation, 69-aa-70, qui correspond à une insertion de deux aa, se retrouve également dans des cas de résistances multiples aux NRTI. Certaines mutations (étoiles noires) rendent la RT hypersensible au NRTI. Ce phénomène est utilisé dans le choix de combinaisons d'inhibiteurs (Tableau 2).



Figure 31 : Localisation des mutations conférant une résistance aux différents NRTIs.

La chaîne polypeptidique des doigts et de la paume est en rouge. Les mutations de résistance sont indiquées par des losanges bleus clairs (résistance aux ddI, ddC et 3TC), bleus foncés (résistance à l'AZT) et violet (résistance croisée à l'AZT). Le complexe A/M est en vert, le dTTP en orange et les ions Mg^{2+} en jaune (d'après (153)).

Dans les deux cas, l'incorporation et l'affinité du dNTP naturel sont peu affectées. En revanche ces études n'ont pas montré de différences significatives d'incorporation de l'AZT triphosphate par une RT comportant les 6 TAMs (190).

➤ *Le mécanisme d'enlèvement ou d'excision de l'analogue incorporé* (Figure 33) (pour revue (122))

La RT du VIH-1 est capable de réaliser la réaction inverse de la polymérisation, la pyrophosphorolyse (PPi-lyse) (Figure 32), qui libère une chaîne d'ADN extensible et l'analogue triphosphate (148, 272). Lorsque l'incorporation du nucléotide suivant est possible, la réaction de polymérisation a 10 000 fois plus de chance de se produire que la PPi-lyse (272, 279), mais quand le dernier nucléotide incorporé est un terminateur de chaîne, la polymérisation ne peut avoir lieu et la PPi-lyse n'est plus négligeable. La PPi-lyse confère ainsi une résistance innée de la RT aux NRTIs. Dans ce cas, la RT sauvage est capable d'enlever efficacement une amorce terminée par un ddT, un AZT ou un d4T (7, 159).

Il a également été montré que la RT résistante à l'AZT (RT^{AZTR}) lie les amorces terminées par l'AZTMP plus fortement que la RT sauvage (39) et que les mutations de résistance à l'AZT induisent une excision accrue de l'AZT présent au niveau de l'amorce ADN, par PPi-lyse (7, 126), bien que cette observation n'ait pas été confirmée par d'autres groupes (41, 231). Enfin, il a été montré que la RT^{AZTR} , contrairement à la RT sauvage ((233, 270), excise efficacement des amorces terminées par l'AZTMP par transfert du terminateur de chaîne à un nucléotide triphosphate, très probablement l'ATP *in vivo* (200, 231, 234, 307), dans une réaction similaire à la PPi-lyse et appelée ATP-lyse (126, 231-233).

Lorsque le nucléotide suivant à être incorporé dans la chaîne d'ADN est absent, la RT^{AZTR} excise non seulement l'AZT, mais également d'autres analogues de nucléotide, avec une efficacité plus faible (246). Cependant, l'addition de concentrations physiologiques du dNTP complémentaire suivant réduit l'enlèvement par ATP-lyse de tous les analogues, excepté l'AZT et l'ABC (231, 232, 246).

Les amorces terminées par des analogues de nucléotides peuvent suivre deux voies : soit le dNTP suivant ne peut se lier efficacement et la réaction d'excision est favorisée, soit la liaison du dNTP suivant perturbe la réaction de réparation et le complexe A/M est piégé dans un complexe quaternaire stable A/M-RT-dNTP appelé Dead End Complex (DEC) (Figure 33). La stabilité du DEC dépend de la nature du terminateur de chaîne, les complexes terminés par de l'AZTMP étant les plus stables (159, 231, 232).

Un modèle d'ATP-lyse, impliquant la RT^{AZTR}, permet d'expliquer son inhibition par le dNTP suivant (27). Le positionnement de l'extrémité 3' de l'amorce dans deux positions distinctes au niveau du site catalytique polymérase est le point central de ce modèle. Dans la plupart des structures cristallines, l'extrémité 3' de l'amorce est localisée dans un site appelé P (Priming) (Figure 32) (91, 165). Dans cette configuration, le nucléotide suivant peut se lier au site N (Nucléotide) (153), et la translocation vers le site P se produit après l'étape chimique d'incorporation du dNTP, probablement après la libération du PPi (27). Selon ce modèle, la réaction d'excision se produit seulement lorsque l'extrémité 3' de l'amorce est positionnée dans le site N. En fait, si l'extrémité 3' est dans le site P, le nucléotide suivant se lie dans le site N, et bloque ainsi l'excision. Cette hypothèse a récemment été confirmée par des études d'empreintes site-spécifique sur les états pré- et post-transloqués de la RT, qui montrent que l'extrémité 3' de l'amorce est en équilibre dynamique entre les sites N et P (219).

La résistance à l'AZT repose sur la sélection de mutations capables d'augmenter la capacité innée de la RT sauvage à exciser un nucléoside en bout de chaîne. Les TAMs ne confèrent pas de nouvelles propriétés à la RT, mais exacerbent des caractéristiques préexistantes de la RT sauvage (159).

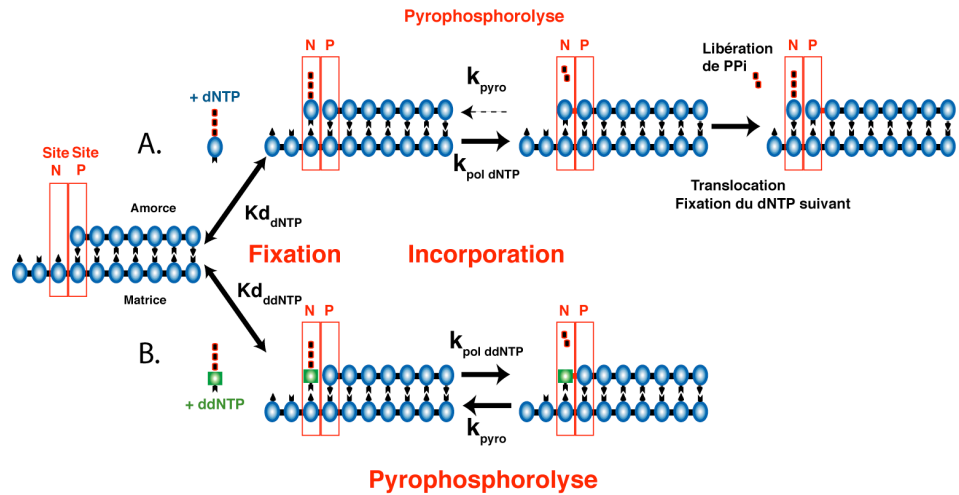


Figure 32 : Incorporation de dNTP (A) ou de ddNTP (B) par la RT.

Le site N correspond au site de fixation du nucléotide et le site P au site de polymérisation de la RT. L'efficacité d'incorporation d'un dNTP ou d'un ddNTP dépend de son affinité pour le complexe Amorce/Matrice : RT (K_d) et de la vitesse d'incorporation (k_{pol}).

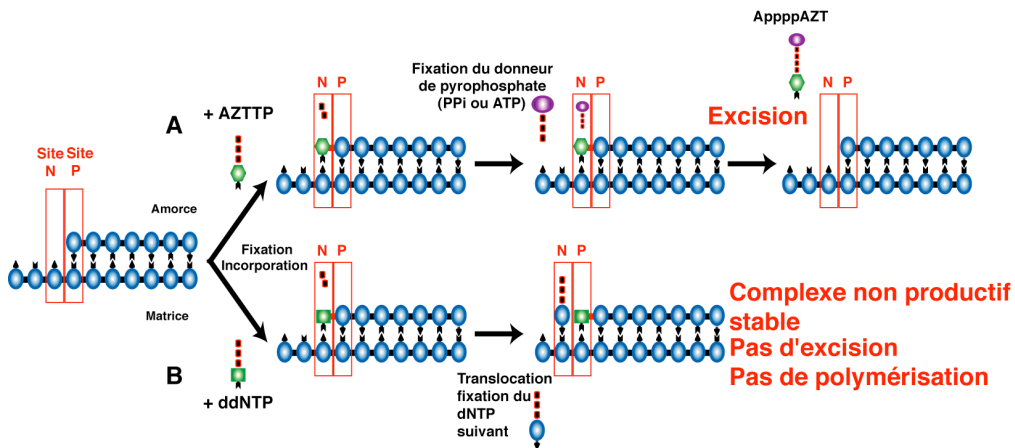


Figure 33 : Modèle d'excision par ATPlyse d'une amorce terminée par de l'AZT (A) et modèle d'inhibition de l'excision d'une amorce terminée par un ddNTP suite à la formation d'un complexe non productif ou "Dead End Complex" (B).

Revue invitée, soumise à Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)

Review

Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication

Valérie Vivet-Boudou, Joël Didierjean, Catherine Isel and Roland Marquet#

Unité Propre de Recherche 9002 du CNRS conventionnée à l'Université Louis Pasteur,
IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

Corresponding author: Tel: +33-3-88-41-70-54; fax: +33-3-88-60-22-18

E-mail address: R.Marquet@ibmc.u-strasbg.fr

Key words: NRTI – Resistance – Reverse transcriptase – HIV-1 – AIDS – Drug – Chain termination – DNA synthesis.

Abstract

HIV-1 reverse transcriptase (RT) is one of the main targets for antiviral therapy. Two classes of RT inhibitors can be distinguished: those that are nucleoside analogues (NRTIs) and those that are not. This review focuses on the NRTIs, which are highly efficient in slowing down viral replication and are used in combination regimens. Unfortunately, the current inhibitors do not completely suppress viral replication and due to the high capacity of adaptation of HIV, allow the selection of drug-resistant viruses. Resistance mechanisms to NRTIs have been extensively investigated and can be divided into 2 types: improved discrimination of a nucleotide analogue relative to the natural substrate or increased phosphorolytic cleavage of an analogue-blocked primer. This knowledge is important both for the development of new drugs designed to target resistant strains and for the development of new antiviral strategies. The nucleoside analogues currently in clinical trials and new developments in this area are also reviewed.

I. INTRODUCTION : HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE AS A DRUG TARGET

In 1983, HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1) was identified as the causative agent of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) [1; 2]. Since then, the reverse transcriptase (RT) encoded by this retrovirus has become one of the major targets for the development of antiviral drugs. RT is an asymmetric heterodimer (p66/p51) harbouring an RNA- and DNA-dependent DNA polymerase activity that catalyses the reverse transcription of the viral genomic RNA into a double stranded proviral DNA, as well as an RNase H activity (for review see [3]). Both catalytic activities are carried by p66, while p51 plays a structural role [4-6].

The p51/p66 heterodimer results from the maturation of a p66/p66 homodimer. The p66 subunit folds into five separate sub-domains : the RNase H domain, which is absent in p51 and corresponds to the C-terminal part of p66, and four sub-domains forming the polymerase domain [4-6]. As with other polymerases, the resemblance of this latter domain to a right hand resulted in the naming of the sub-domains as “fingers”, “palm”, and “thumb” [6]. The fourth polymerase sub-domain, called “connection”, joins the polymerase and the RNase H domains [6].

Even though the four polymerase sub-domains of p66 and p51 share a very similar tertiary structure their relative positioning are different, so that the polymerase domain of p51 and p66 are quite different. Unlike p66, p51 has no cleft, and the residues involved in the polymerase activity are buried [4-6].

Antiviral treatments (<http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/fdadrug.htm>) combine RT and protease inhibitors (PI) and have recently been supplemented with an inhibitor of the viral and cellular membranes fusion, T20 [7; 8]. Two classes of RT inhibitors can be distinguished: those that are nucleosides analogues (NRTIs) (Figure 1) and those that are not (NNRTIs). NRTIs are competitive inhibitors with respect to the natural deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), whereas NNRTIs are allosteric non-competitive inhibitors [9]. NNRTIs bind to a hydrophobic pocket adjacent to the polymerase active site on the p66 subunit and induce structural modifications that decrease the nucleotide incorporation rate [9] by displacement of the catalytic aspartate residues [10].

II. NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE

INHIBITORS AND RESISTANCE

1. The Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase inhibitors (NRTIs)

AZT (zidovudine), a thymidine analogue with an azido group in place of the hydroxyl group at the 3' position of the ribose (Figure 1) was the first drug approved by the FDA, in 1987. This molecule displayed excellent antiviral activity in cell culture assays [11]. It was followed by the approval of the dideoxynucleosides ddI (didanosine) and ddC (zalcitabine) [12; 13] by compounds with a double bond between positions 2' and 3' of the dideoxyribose, d4T (stavudine) and ABC (abacavir) and, more recently, by molecules with a β -L-oxathiolane ring system instead of the ribose ring of canonical nucleosides, 3TC (lamivudine) and FTC (emtricitabine) (Figure 1). The family of FDA-approved NRTIs was extended in 2001 to a nucleotide analogue, tenofovir disoproxil fumarate (TDF). TDF is an acyclic nucleoside phosphonate diester analogue of adenosine, requiring an initial diester hydrolysis to generate tenofovir (PMPA) (Figure 1).

The NRTIs are administered as unphosphorylated prodrugs that are consequently recognized by cellular kinases after their penetration into the host cell. Nucleoside analogues must be tri-phosphorylated [14; 15], while TDF, which already possesses one phosphate group, must be di-phosphorylated [16]. In addition, ddI and ABC undergo a cellular activation step that converts them into ddAMP [17] and CBVMP, respectively [18]. Consequently, the intracellular concentration of the active NRTI depends on the rate of prodrug activation. Generally, it is the first phosphorylation step that is the slowest, except for AZT where the nucleoside monophosphate phosphorylation step is limiting [19-21].

The tri-phosphorylated NRTIs bind to the polymerase active site of RT (Figures 2A and 3A,B). Once incorporated into the growing DNA chain, they act as chain terminators because they lack a 3' hydroxyl group on the NRTI ribose or pseudo-ribose moiety. This prevents 3'-5' phosphodiester bond formation, blocking further extension of the DNA (Figure 3A,B).

2. Emergence of resistance mutations

Base substitutions associated with increased resistance to the drugs used were rapidly observed in the *pol* gene encoding the RT of patients treated with NRTIs (for review, see [22] and for a compilation of all the known RT mutations, see [23]) (Figure 2B). The rapid

emergence and selection of resistance mutations is explained by the low fidelity of HIV-1 RT [24-26], the high level of HIV-1 replication [27] and the high rate of RT-mediated recombination [28; 29]. The threshold of significance in terms of drug resistance *in vivo* is reached when 3 to 4-fold resistance arises. Drug-resistant variants have in most cases a better viral fitness under conditions of drug pressure, but their overall rate of replication in the absence of drug is generally lower than wild-type (WT) viruses [30].

Early clinical observations revealed that patients undergoing AZT mono-therapy for 6 months or more displayed highly reduced sensitivity to this drug [31], while remaining sensitive to ddI and ddC [31; 32]. High-level resistance toward AZT was associated with mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, and K219Q (Figure 2A), but most AZT-resistant HIV-1 isolates contain only a subset of these mutations [33-37]. The same set of mutations were found in resistant virus isolated from cell cultures treated with AZT [38; 39]. Interestingly, they were also observed in isolates of patients under d4T therapy (Figure 2B) [40-44] or in combination regimens of AZT or d4T with other NRTIs [36; 37; 40-42; 44-46]. This set of six mutations providing resistance toward AZT and d4T was therefore named the TAMs (Thymidine Associated Mutations). TAMs also occur in about 10 % of individuals receiving ddI mono-therapy [47; 48].

The TAMs are located both in the fingers and in the palm sub-domains of RT, at the front of the nucleotide binding pocket (Figure 2A). T215Y is the main mutation observed *in vivo* and is considered as the most important for the resistance phenotype [36; 49; 50]. It causes intermediate (10 to 15-fold) resistance to AZT. K70R and T215Y are antagonist in their effect on AZT resistance and only occur together if other TAMs are present as well [51; 52]. Four or more TAMs trigger >100 fold resistance to AZT, contribute to cross-resistance to other NRTIs [53-55], and induce 5 to 7-fold resistance to ABC [56] and 2 to 5-fold resistance to d4T [57; 58], ddI [59], ddC and tenofovir [60-63] (Figure 2B). These mutations cause low level resistance to 3TC that do not compromise the effectiveness of 3TC, which is therefore often present in tri-therapies, even in patients bearing multiple TAMs [64; 65].

Upon 3TC mono-therapy, the first mutation to appear is M184I [66-69], associated with high levels of resistance. Because of the low enzymatic efficiency of the M184I RT, mutation M184V, which confers >100-fold resistance to 3TC [51; 66; 68; 70-72], as well as to FTC [67; 68] is rapidly selected both *in vitro* and *in vivo* [73]. The same mutation is also often observed during ABC mono-therapy [56; 68; 74] (Figure 2B).

Mutation at position 74 (mostly L74V) is frequently found in patients receiving ddI mono-therapy [48; 68; 75; 76] and also occurs during ABC mono-therapy [56; 74]. In the

former case, L74V is associated with other mutations (mainly M184V) [77]. The L74V mutation causes virologic failure primarily in patients receiving ddI [75; 76; 78], but not ABC mono-therapy and prevents antiviral activity when ddI is used for intensification [79]. The L74V mutation also confers 2 to 5-fold resistance to ddC [75] (Figure 2B).

Mutation K65R emerges after mono-therapy with ddI [48; 80], ddC [80; 81] or ABC [74], and during tenofovir intensification [60; 82]. K65R is also frequently selected in cell culture by ABC [77], tenofovir [60] and d4T [83] and its incidence increased recently, mainly in patients receiving tri-therapies excluding AZT [84-86]. K65R confers intermediate resistance levels to ddI [87], ddC [80; 87; 88], 3TC [87-89], d4T [83], tenofovir [60; 90], and ABC when associated with other mutations [77] (Figure 2B).

Position T69 is the most commonly mutated site after the TAMs and M184V. Initially, T69D was only associated with ddC resistance [91], but was subsequently found after treatment with each of the NRTIs. Mutation at position 69 is associated with intermediate level resistance to ddI [92], and also contributes to resistance to each of the NRTI in the context of TAMs [60; 93-96]. In about 2% of heavily treated HIV-1 infected patients [97] having received prolonged AZT treatment followed by administration of other NRTIs, RT has a dipeptide insertion (SA, SG or mainly SS) between position 69 and 70, associated with other amino-acid substitutions such as T69S or T215Y and other TAMs [97-99]. Individually, the dipeptide insertions confer only low level of resistance to each of the NRTIs, but in the context of T215Y and other TAMs, high levels of resistance to AZT and moderate levels to d4T, ddC, ddI and tenofovir, are achieved [98-102] (Figure 2B).

Mutation at position 75 (V75T) develops in response to increasing concentrations of d4T as the sole drug in cultured cells infected by HIV-1 [49]. In the clinic, V75T occurs at a 10% frequency [44; 103], mainly on AZT-naïve patients [104]. V75T causes intermediate level (5-fold) resistance to d4T, ddI and ddC and FTC [49] (Figure 2B).

The aim of the initial antiviral treatment for newly infected patients is to decrease as quickly as possible the viral load to an undetectable limit. All associations of NRTIs, NNRTIs and PIs are not possible, due to either insufficient efficacy (ABC + TDF + 3TC), high induced toxicity (d4T + ddI), antagonist effects (AZT + d4T) or synergistic toxicity (efavirenz + nevirapine) [65]. Commonly used multi-therapies combine two NRTIs with one NNRTI or one PI. Table 1 summarizes recommended, conceivable and contraindicated combinations [65].

Several studies have shown that combining 2 NRTIs with 1 NNRTI was as efficient as the combination of 2 NRTIs with 1 PI. However, a poor observance of treatments with one

particular NNRTIs rapidly enables the selection of mutations conferring resistance to the entire class, whereas PIs rarely generates mutations rendering the HIV-1 protease resistant to all PIs [65]. Only one multitherapy based on a combination of three NRTIs (AZT, 3TC and ABC) is efficient enough to be prescribed (Trizivir®).

3. Resistance mechanisms

Mutations associated with resistance to NRTIs reside primarily in the palm and fingers sub-domain of RT and give rise to 2 types of resistance mechanisms (for review, see [105; 106]: (i) improved discrimination during polymerisation and at the active site of the mutated drug-resistant RT of a dNTP analogue relative to the natural dNTP; (ii) increased phosphorolytic cleavage of an analogue-blocked primer. The latter resistance mechanism is mainly due to the TAMs.

3.1. Resistance by discrimination during incorporation

The incorporation efficiency of a dNTP analogue into DNA, and hence its DNA termination potency, relies on 2 factors: (i) competition of the dNTP analogue with its natural counterpart for binding to the RT active site, reflected by their respective dissociation constant (K_d) (ii) subsequent incorporation into the DNA with a favourable catalytic rate constant (k_{pol}) (see Figure 3A). The NRTI-induced mutations either interfere with NRTI binding and/or with its incorporation rate into the growing DNA chain.

3.1.1. Mutation M184I/V

This mutation is located in the palm sub-domain of HIV-1 RT, within the highly conserved catalytic motif YMDD, that interacts with the 3' end of the primer, the incoming dNTP and the metal cofactors [107] (Figure 2A). The crystal structure of a DNA/DNA-M184I RT complex revealed that replacement of the Met side chain by either Val or Ile causes steric hindrance with the sulfur atom present in the ribose ring of 3TC and FTC [108]. Most kinetic studies have shown that such structural conflict results in decreased affinity of these dNTP-analogues for the mutated enzyme [109-111].

The M184V mutation is also associated with increased fidelity [112-115] and/or decreased processivity [116; 117], related to significant decrease in the viral replication capacity compared to WT. Accordingly, reversal of M184V was observed in patients interrupting 3TC treatment [118], indicating that this mutation reduces viral fitness. The

impact of M184V on viral replication is also related to the activation state of the cells: it is more pronounced when dNTP pools are smaller [119]. Importantly, the increased fidelity does not limit the ability of HIV to develop new mutations under more diverse drug pressure (for review, see [120]). In addition, M184V RT is impaired in the by-passing of some rate-limiting steps during reverse transcription involving RNA-primed DNA synthesis, *ie.* initiation of (-) strand DNA synthesis (from the tRNA₃^{Lys}) and initiation of (+) strand DNA synthesis (from the poly-purine tract (PPT) sequence) [121]. Release of the same enzyme from strong pausing sites was also found to be a major obstacle for efficient DNA synthesis [121].

3.1.2. Mutation L74V

In the case of L74V, which weakens viral replication in the absence of drug [75; 121-123], resistance was explained by altered substrate and inhibitor recognition by the mutant enzyme [78]. Enzymatic studies reported a decreased processivity [123] and reduced incorporation of the dNTP-analogue. L74V was also found to improve RT fidelity [124], and similarly to M184V, it affects initiation of reverse transcription and release from pausing sites [121]. These effects were even more pronounced in the double mutant L74V+M184V [121]. Interestingly, L74V induces hypersensitivity to AZT [75; 89] (Figure 2B), and is rarely found with AZT/ddI dual nucleoside therapy, making it an advantageous combination. Indeed, L74V alone or associated with other TAMs inhibits primer-rescue of AZT-blocked primers [125; 126] (see below).

3.1.3. Mutation K65R

Position 65 of HIV-1 RT is located in the flexible α 3- α 4 loop in the fingers sub-domain (Figure 2A). *In vitro* studies have reported contradictory increased [127], decreased [128] or unchanged [81] processivity of K65R RT compared to the WT RT, depending on the nucleotide concentration used. Pre-steady state kinetics showed that mutation K65R reduces the incorporation of ddI and ddC, as compared to the natural dNTPs, by affecting k_{pol} [129]. The increased discrimination between dNTPs and ddNTPs, which share the same α -phosphate, cannot be explained by the interaction of the side chain of K65 with an oxygen of the α -phosphate of the incoming dNTP [107]. Rather, an intramolecular oxygen bond between the 3'-OH of the ribose and an oxygen of the α -phosphate was found to be crucial for polymerisation. In such context, the effect of K65R mutation is to amplify the negative impact associated with the lack of the 3'-OH on ddNTPs [129]. K65R RT also displays improved

fidelity compared to WT RT [130]. Importantly, K65R hypersensitizes HIV-1 to AZT [55; 98; 131] and does not develop in patients receiving AZT-containing regimens [132]. K65R also induces moderate resistance to tenofovir [60; 62] due to a reduced k_{pol} of tenofovir-PP [133]. However, the combination of K65R with M184V restores sensitivity to this drug [60; 62; 128], due to further reduction in incorporation of the natural substrate dATP [133]. Hence, the reduced fitness of the double mutant virus is explained by the general reduction in incorporation of the natural dNTPs. In the case of mutations K65R and L74V, both selected by ddI, but never selected together in the clinic, an 84-fold loss in the catalytic rate constant compared to the WT RT accounts for the poor ability to use natural dNTPs and the resulting poor viral fitness [134].

3.2. TAM-associated resistance by nucleotide-analogue excision

3.2.1. Pyrophosphorolysis and ATP-mediated removal of AZT

The TAM-associated mechanism of resistance to AZT remained long unexplained. Indeed, the small increase in AZT discrimination between the WT and AZT resistant RT (^{AZTR}RT) could not account for the >100-fold resistance patterns observed in patients [135]. In addition, WT and AZT-resistant virions were found to be similar in their endogenous reverse transcription patterns [136]. However, TAMs were shown to confer resistance to AZT in an *E.coli* strain in which the DNA Pol I was replaced by the HIV-1 RT, indicating that no eukaryotic factor was involved in the resistance mechanism [137].

Clues about the resistance mechanism came from different experiments. First, HIV-1 RT, which lacks 3' exonuclease proofreading activity [24], is however capable of pyrophosphorolysis (PPi-lysis), the reverse reaction of polymerisation, releasing an unblocked, extensible DNA chain and the analogue-triphosphate [138; 139] (Figure 3A). It was also reported that ^{AZTR}RT binds AZTMP-terminated primers more tightly than WT RT does [140] and, at the same time, that AZT-resistance mutations lead to enhanced excision of AZT from the nascent DNA by PPi-lysis [141-143], although this observation was not confirmed by other groups [144; 145]. Finally, it was shown that the ^{AZTR}RT efficiently unblocks AZT-terminated primers by transfer of the chain terminator to a nucleoside triphosphate, most likely ATP *in vivo* [145-148], in a reaction similar to PPi-lysis and named ATP-lysis [143; 145; 149; 150]. This reaction yields a 5'-5' dinucleoside tetraphosphate, AZTppppA, [149] (Figure 3B) and is very inefficient with WT RT [145; 151].

3.2.2. Effect of the next complementary nucleotide and formation of a Dead-End Complex (DEC)

In the absence of the next correct nucleotide to be incorporated into the growing DNA chain, ^{AZTR}RT excises not only AZT [145; 150], but also other nucleotide analogues, and the excision rate follows the trend AZT>d4T>>ddC>ABC>3TC>ddI>tenofovir [152]. However, the addition of physiological concentrations of the next complementary dNTP reduces ATP-mediated removal of all analogues except AZT and ABC [145; 150; 152]. This data helps to explain why the TAMs confer higher levels of resistance to AZT than to d4T or ddI. It also explains why, despite the selection of TAMs during d4T treatment, there is no resistance detected in conventional *in vitro* phenotypic drug susceptibility assays that use cell lines with high dNTP pools.

The inhibition of the excision reaction by the next incoming dNTP was explained by formation of a stable quaternary P/T-RT-dNTP complex called “dead-end complex” (DEC) (Figure 3B and C). The stability of the DEC depends on the nature of the chain terminator, AZTMP-terminated complex forming the least stable DEC, and there is a direct correlation between the stability of the DEC and the inhibition of the PPi- or ATP-dependent removal reaction by the incoming dNTP [145; 150; 153].

3.2.3. A model for the excision reaction (Figure 3B,C)

On the basis of the above biochemical and structural data, a model for the ATP-mediated NRTI excision by ^{AZTR}RT and its inhibition by the next complementary dNTP was developed [154]. Central to this model is the possible positioning of the 3' end of the primer in two distinct positions in the polymerase active site (Figure 3). In most crystal structures, the 3' end of the primer is located in the so-called P (Priming) site [5; 155]. In that configuration, the next incoming nucleotide can bind to the N (Nucleotide binding) site [107], and translocation to the P site occurs after the chemical step of dNTP incorporation, probably after PPi release [154]. Recent site-specific footprinting experiments on pre- and post-translocational complexes showed that the 3' end of the primer is in dynamic equilibrium between the N- and P-sites [156]. According to the model, the excision reaction occurs only when the 3' end of the primer is positioned in the N-site. The crystal structures of frozen pre- and post-translocated complexes, where an AZTMP-terminated primer strand is cross-linked to the RT, have also been solved [157]. Docking of the next incoming dNTP into the X-ray structure of the post-translocated AZTMP-terminated complex suggests that steric crowding due to the azido group impairs formation of a stable DEC [157], in agreement with the

biochemical data. Thus, the amount of N complex should be increased, favouring excision. Experiments showing that AZT excision was enhanced in cross-linked pre-translocated complexes compared to post-translocated complexes confirmed this hypothesis [158]. Interestingly, the rather specific AZTMP excision is mainly provided by the nature of the dNTP analogue, rather than by the TAMs [154]. However, site-specific footprinting revealed that the mutations favouring primer unblocking increase the fraction of primer residing at the N-site [156] and recent data showed that only 3'-azidopyrimidine nucleosides and not 3'-azidopurine nucleosides are excised efficiently by ^{AZTR}RT [159].

3.2.4. Open questions

Early biochemical experiments showed that D67N and K70R were the mutations most responsible for rescue of chain-terminated primers [141; 145]. More recent structural and modelling studies suggested that T215Y increases the affinity of the ^{AZTR}RT for ATP [154; 160] resulting in higher levels of ATP-lysis. Experiments showing that Tyr 215 allows the establishment of π - π interactions with ATP [147] further supported this idea.

However, recent mechanistic [151; 161] and biochemical data [162] challenged that model. Indeed, pre-steady state kinetics performed the group of K. Anderson [151] and by us (Rigourd et al, unpublished data) showed that (i) PPi-lysis is more efficient than ATP-lysis to remove AZT and other dNTP-analogues, both with WT and ^{AZTR}RTs (ii) ATP is not bound more tightly by ^{AZTR}RT. Instead, it seems that TAMs are involved in effective positioning of the ATP for the catalytic attack of the terminating dNMP, via Tyr215 [161] and possibly via residues 67 and 70 [151]. The role of the latter residues was recently confirmed by the finding that 67N/70R/219Q RT displayed higher rates of primer unblocking than 41L/210W/215Y RT [126].

Interestingly, several groups have shown that rescue of a chain-terminated primer can effectively occur by PPi-lysis, with WT RT, thus conferring an innate resistance toward dNTP-analogues [139; 144; 153; 163]. Remarkably, the NRTIs that frequently select TAMs are those that are the most effectively pyrophosphorolysed by WT RT in the presence of the next incoming dNTP, indicating that TAMs do not confer new properties to the enzyme, but rather exacerbate pre-existing features [153]. In view of these results and the above mentioned data on ^{AZTR}RT and ATP affinity, the reason why resistance emerges by using ATP-mediated primer unblocking is still not clear.

Recently, the levels of the potential endogenous acceptors for the unblocking reaction, mainly ATP and PPi, were precisely measured in H9 cells, macrophages as well as in unstimulated and activated T cells [148]. ATP was present at similar levels in all cases (1.3 to 2.7 mM), consistent with previous literature data. The levels of PPi however were found to be much lower than expected, 7 to 15 μM in unstimulated cells, reaching 55 to 79 μM in activated cells. At the latter PPi concentrations, in conditions where the bulk of the viral replication and hence selection for AZT resistance mutations seem most likely to occur, PPi-lysis prevailed, with similar rates of excision for WT and ^{AZTR}RTs. This suggests that selection of AZT-resistance mutations and enhanced ATP-lysis by ^{AZTR}RT are only manifested in an environment where the PPi concentration is low.

3.2.5. Other factor involved in efficiency of primer-rescue

i. The primer-template sequences

The DNA or RNA nature of the P/T is also critical for the rescue reaction. Indeed, removal is less efficient during RNA-directed processes [151; 164], and even totally abolished during the tRNA₃^{Lys}-primed initiation phase of reverse transcription [164]. In addition, not all AZTMP or other dNTP-analogue incorporation sites are repaired the same [147; 153; 160; 163; 165]. Accordingly, it was shown that rescue of AZTMP-blocked primers was sequence dependent [156; 166], due to a selective decrease of the amount of pre-translocation complex [156]. In addition, ddTMP- or AZTMP-terminated complexes are less influenced by sequence specific interactions than ddA-, ddC- or ddG-terminated ones [167]. The major sequence determinants affecting removal efficiency are located at the 3'-primer terminus and within the 6 base pairs upstream of it [167]. These determinants must interact with RT in a sequence dependent manner that affects the removal reaction.

ii. The RNase H activity of HIV-1 RT

The influence of HIV-1 RT RNase H activity itself and/or potential mutations in the RNase H sub-domain associated with drug therapy are potentially strongly underestimated, given that genotypic analysis for clinical drug resistance usually does not include this sequence.

Once a chain terminator like AZT or d4T is incorporated, there is competition between primer repair and RNase H activity, the latter potentially leading to a premature dissociation of the newly synthesised DNA from the RNA template that would block replication. In agreement with this hypothesis, mutations reducing the RNase H activity lead to increased

AZT and d4T resistance, most likely by increasing the time available for excision [168]. These mutations have no influence on the resistance to 3TC or efavirez that do not involve excision [168]. Simultaneous RNase H mutations and TAMs increased resistance to NRTIs in a synergistic manner [168]. Importantly, mutations reducing RNase H activity were detected in AZT and d4T treated patients [168].

iii. Synergy between NRTIs and NNRTIs

It is well documented that combination therapies using the 2 classes of RT inhibitors exert a synergistic inhibition on HIV replication. Early mechanistic studies demonstrated that the natural dNTPs and NNRTIs can bind simultaneously to their respective sites [9] and suggested communication between the 2 sites. Synergy between NRTI and NNRTI was confirmed by experiments showing that NNRTIs inhibit the ATP-mediated removal of several dNTP analogues through an effect on both the catalytic rate of the chemical step of ATP-mediated hydrolysis and the binding of ATP to the RT, resulting in an overall decrease in the efficiency of removal [169-171]. More recently, it was suggested that inhibition of the basal phosphorolytic activity of WT RT by NNRTIs may also account for the synergy found in antiviral assays [172].

iv. Other suppressive mutations involved in AZT resistance

Mutation Y181C/I

Mutations Y181C/I, located in the hydrophobic pocket adjacent to the polymerase active site, confer resistance to several NNRTIs [173]. Even though it was found early on that mutation Y181C partially suppresses AZT-resistance in the context of TAM-bearing RTs [174], the mechanism for it was elucidated only recently. It appears that desensitisation is due to neither increased discrimination, nor enhanced DEC formation, but rather to reduced ATP binding, resulting in a less efficient ATP-mediated unblocking reaction [175]. Finally, mutation Y181I alone confers cross-resistance to d4T only, by increasing both discrimination against d4TTP and its ATP-dependent excision [176].

The Δ 67 complex

Viruses highly resistant to AZT isolated from patients undergoing long-term antiretroviral therapy contain, in addition to the usual set of AZT resistance mutations, a deletion at position 67 (named the Δ 67 complex) [92]. RTs of such viruses are highly efficient in excising

AZTMP, at lower ATP concentration compared to other ^{AZTR}RTs [177]. They are however less efficient in excising a broad spectrum of NRTIs as compared to standard ^{AZTR}RTs, but still more efficient as WT RT. Such $\square 67$ viruses would therefore replicate reasonably well in quiescent cells, even in the presence of AZT.

3.3. Cross-road between the two resistance mechanisms

3.3.1. TAMs associated to other point mutations

The M184V mutation, in the context of some of the TAMs, namely M41L/T215Y, decreases susceptibility to ddI, ddC and ABC but resensitises the virus to AZT, d4T and tenofovir [55; 95; 178-181]. This is due to inhibition of AZTMP excision by ATP-lysis, which occurs only in the context of the TAMs, and not in a WT background [143; 160]. However, with four or more AZT-resistance mutations, resensitisation to AZT is overcome [55; 68]. Another clinical benefit of mutation M184V is the later emergence of TAMs [182]. Finally, M184V associated with T215Y interacts synergistically to decrease RT processivity [141]. The combination of M184V/T215Y + K219Q reverses that effect and enhances processivity even more compared to WT [183].

Inhibition of the rescue of AZT-blocked primers by ATP-lysis was also observed when L74V mutation was present either alone or in combination with TAMs [125; 126], and it was established that this effect was not due to changes in the ratios of pre- and post-translocationnal complexes [125].

3.3.2. Mutation V75T

Pre-steady state experiments showed that V75T has a direct effect on dNTP selectivity by discriminating about 3-fold d4TTP relative to dTTP, but also increased the polymerisation rate by facilitating translocation along single-stranded templates. The modest increase in discrimination is further potentiated by an increased rescue of d4TMP-terminated primers by PPi, but not ATP-lysis [184]. Position V75 is therefore at the cross-road of the 2 mechanisms involved in drug resistance.

2.3.3. Multi-drug resistance

Most of the single resistance mutations are associated with resistance to specific RT inhibitors. However, there is also wide cross-resistance between anti-retroviral drugs of the

same family and even of different classes. Combination therapies often give rise to multiple ddNTP-resistant RTs that mainly fall into 2 categories : (i) the Q151M mutation, where RT remains susceptible to tenofovir and 3TC [60; 61] (ii) insertion mutations at position 69, where viruses have reduced susceptibility to all currently approved NRTIs, including tenofovir.

i. The Q151M complex

One of the multiple ddNTP-resistant viruses carries a set of five mutations (Q151M/A62V/V75I/F77L/F116Y) that reduce considerably sensitivity to AZT, ddI, ddC and d4T *in vivo* [185; 186] (Figure 2B). Amongst these point mutations, Q151M, a two-base-pair substitution close to the first nucleotide of the single-stranded region of the template [107; 187] (Figure 2A), is a key mutation [188; 189] which appears first during the course of the treatment, in 5% of the patients receiving dual ddI/AZT or ddI/d4T therapy [40; 44; 97; 190; 191], but rarely with 3TC-containing regimens. Q151M causes intermediate level of resistance to AZT, ddI, ddC, d4T [188; 192-194] and ABC [194] and, when followed by the 4 other mutations, generates viruses with significant resistance to the previously cited ddNTP-analogues and low-level resistance to 3TC and tenofovir [61; 178]. Steady-state kinetics pointed to altered recognition of the incoming dNTP as the mechanism of drug resistance [146; 195]. Furthermore, pre-steady state kinetics on the Q151M RT, as well as the RT bearing all 5 resistance mutations, showed that the binding constant of the dNTP-analogue remains unchanged while a selective decrease of the k_{pol} for phosphodiester bond formation explains improved discrimination [196]. Mutation Q151M was also associated with increased RT fidelity [197].

ii. Mutation/insertion at position 69

In the absence of TAMs, RTs with SG and AG, but not SS insertions at position 69 have increased unblocking activity but all have decreased sensitivity to dNTP inhibition [167; 198]. In the context of the TAMs T215Y and M41L, insertions at position 69 induce increased AZT excision via ATP-lysis [167; 198-200] by destabilising the DEC, so that positioning of the nucleotide analogue at the N site is favoured [199]. Efficient excision of d4T also occurs in this context, even in the presence of high concentrations of the next complementary dNTPs [167; 199]. In addition, the enzyme also removes, at a lower rate compared to AZT or d4T, the other ddNTPs and dNTP analogues much more efficiently than the WT RT or RT bearing the classical TAMs [199; 200]. Resistance is further increased in this mutant by a reduced

incorporation of 3TC, and to a lesser extent ddI [199]. Indeed, when associated with TAMs, the T69S-SS mutation generates resistance to all NRTIs, including tenofovir [200]. A slight increase in tenofovir discrimination does not account for the resistance observed, which is due to enhanced ATP-lysis compared to T69S+TAMs- or WT RTs. In the case of the T69S-SS +TAMs RT, the next incoming dNTP hardly inhibits the unblocking reaction [200]. Recently, an 8 aa insertion at position 69 has been reported, in the context of the TAMs, for a patient receiving an AZT and ddC combination therapy [201]. Such mutant enzyme has increased resistance to a wide range of drugs and the size and sequence of the inserted sequence influences the level of resistance to dNTP analogues.

A single aa insertion mutation together with T69S/T was recently selected in association with Q151M+F116Y [202]. The clinical consequences of such mutations have yet to be determined but modelling experiments suggested that there would be no steric clash between the side chains of the mutated residues, implying that such RTs should be functional.

iii. Mutation Q145M/L

Recently, a new mutation, Q145M/L, located in the nucleotide binding pocket, was reported in patients failing therapy [203], with a frequency comparable to the insertion mutation. This mutation appeared to be associated with resistance to both NRTIs and NNRTIs. Because of its proximity to position 151, it was suggested that Q145 might also be involved in dNTP discrimination. It was shown in assays of HIV-1 recombinant strains that Met and Leu were the only changes at this position that confer drug resistance to NRTIs and NNRTIs [204]. Steady-state kinetics studies of the recombinant RTs bearing these mutations revealed a strong loss of catalytic efficiency and significant resistance to AZT and efavirenz [204].

III. NEW NUCLEOSIDE-ANALOGUE INHIBITORS

1. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors in clinical development

In addition to the previously described FDA approved anti-HIV NRTIs, several new nucleoside analogues were designed and developed to improve safety and efficacy profiles and to minimize cross-resistance. The following paragraphs summarize the data relative to the compounds currently in clinical trials: Amdoxovir, Reverset, Elvucitabine, Racivir, SPD754, Alovudine, DOT, MIV-210 and KP1212. (Figure 4) Additional information is available in

older excellent reviews [205; 206] and on the web (www.thebody.com/tag/articles/pipeline.html); <http://aidsinfo.nih.gov/drugs/drugtype.asp?type=2>; <http://www.aidsmap.com/en/docs/ux/drugs.asp?new=1§ion=C92B1B00-7482-449B-B50B-931A8014FBF2>)

1.1. Amdoxovir, DAPD, (2R,4R)-4-(2,6-diaminopurin-9-yl)-1,3-dioxolane-2-methanol or (-)-β-D-2,6-diaminopurine dioxolane

Amdoxovir, currently in phase II clinical trials, is a purine nucleoside analogue designed to be a more soluble and bioavailable prodrug of the anti-HIV agent (-)-β-D-dioxolane-guanine (DXG)[207]. It is rapidly absorbed and deaminated *in vivo* by adenosine deaminase) to generate DXG [208], which is phosphorylated intracellularly to yield the active metabolite DXG-5'-triphosphate. DXG-TP is incorporated approximately 17-fold more slowly than the natural substrate dGTP [208] and acts as a chain terminator[209]. *In vitro*, DXG demonstrated an anti-HIV-1 activity greater than that of d4T, ddI and adefovir, comparable with that of 3TC and ABC, but lower than that of AZT and FTC [210].

In vitro analysis indicated that HIV-1 strains resistant to AZT, 3TC, ddI, ddC, ABC, NNRTIs, and PIs were still susceptible to DXG [211-213]. Viruses containing the multidrug resistance-associated mutations G333E and the SS insertion between codons 69 and 70 were also sensitive to DXG [210]. There are some evidences that the wide activity spectra of amdoxovir against HIV resistant strains is related to its unique structure, with an oxygen atom in the 3' position of the sugar ring [214; 215]. *In vitro*, DAPD/DXG demonstrated synergistic antiviral activity with AZT, 3TC, and nevirapine [211], as well as enfuvirtide (fuzeon) [216], and mycophenolic acid [217]. A phase I/II study presently compares the effect of concurrent administration of amdoxovir and the fusion inhibitor fuzeon to current regimens in HIV-infected patients [218]. On the other hand, viruses containing a L74V mutation or a K65R and Q151M double mutation were fully resistant to DXG, whereas viruses containing K65R or Q151M mutation alone were only moderately resistant [210; 211; 217]. Under amdoxovir therapy, HIV-1 developed the K65R and L74V mutations [212].

Long-term toxicology studies indicated that high doses of amdoxovir were associated with lenticular opacities in monkeys and obstructive nephropathy in rats due to the limited aqueous solubility of amdoxovir/DXG. In humans, amdoxovir is generally well tolerated and the most frequently occurring adverse effects reported were headache, pain, nausea, diarrhoea,

skin rash, abdominal pain, malaise and tooth disorder. Kidney problems were not seen in phase I clinical trials, but in one of the pilot studies, five patients had to stop the drug because of eye problems [219].

1.2. Reverset, RVT, D-D4FC, 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine, DPC 817

Reverset, formerly known as DPC 817, is currently in phase IIb clinical trials under a FDA-approved Investigational New Drug (IND) protocol and two pivotal phase III studies should start in the second half of 2005. Reverset is a cytidine nucleoside analogue with potent anti-HIV activity in treatment-naïve and -experienced patients [220; 221]. After phosphorylation by cellular kinases, the triphosphate analogue inhibits HIV RT by competing with the natural substrate (dCTP) and inducing chain termination with a more than 40-fold decrease in viral load [222]. One hypothesis to explain the potency of reverset against HIV-1 was that the fluorine atom on the heterocyclic base increased the overall efficiency of nucleotide incorporation during viral DNA synthesis [223]. Reverset has a long half-life in human whole blood. However, it is unstable in acidic medium; so, it should be given with an antacid agent or in a buffered solution for oral administration [224].

In vitro cell culture experiments suggested that the antiviral effects of reverset are additive and in some cases synergistic with PIs, NNRTIs and NRTIs [225]. Reverset is active against HIV-1 strains resistant to AZT, 3TC, d4T and tenofovir [222; 226], as well as strains co-resistant to AZT and 3TC and several strains bearing double and triple mutations [224]. Activity against 3TC-resistant strains was also reported in the SCID-hu Thy/Liv mouse model [227]. Reverset is also active against viruses with TAMs, such as the 215 mutation, but not against the multinucleoside resistance mutations Q151M or 69SS [228]. In addition, reverset selects for the K65R mutation, which confers 5.3- to 8.7-fold resistance to this nucleoside analogue [228]. The *in vitro* results were confirmed by phase IIa clinical trials in treatment-experienced patients: by adding reverset to NRTIs (including 3TC or tenofovir) failing regimen, viral load was reduced by at least 0.7-0.8 log₁₀ copies/mL [229].

In phase I studies, reverset was well tolerated in all patients with no significant adverse effects [230]. In phase IIa clinical trials, the most common side effects were cold symptoms, headache, and fatigue with no known raised lactate levels or mitochondrial toxicity ([222]). To date, the only noticeable adverse effect is a higher incidence of asymptomatic hyperlipasemia (a marker of pancreatic inflammation) in patients also receiving ddI, a known problem when other NRTIs were used in combination with ddI.

1.3. Elvucitabine, ACH-126,443, L-d4FC, 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-β-L-5-fluorocytidine

Elvucitabine is currently in late phase II studies. This β-L-nucleoside analogue is the mirror image of reveset and was designed to improve the activity observed with 3TC. Once phosphorylated intracellularly by cytoplasmic deoxycytidine kinase, L-d4FC-TP acts as a chain terminator and has 10- to 20-fold greater antiviral activity compared to 3TC, probably because of better pharmacokinetic parameters. Indeed, elvucitabine has excellent oral bioavailability and an intracellular half-life that exceeds 24 hours [231; 232].

In vitro, elvucitabine did not show loss of sensitivity against clinical strains of HIV with known nucleoside and non-nucleoside resistance. Elvucitabine exhibits synergistic activity with d4T or AZT, and additive activity with ddC or ddI [231]. In *in vitro* resistance studies, two mutations simultaneously emerged in RT, M184I and D237E, conferring ~10-fold resistance to elvucitabine [233]. The rapid switch of M184I to M184V described with 3TC was not observed in the case of elvucitabine. On the other hand, the D237E mutation has not been reported previously. Preliminary cross-resistance study indicated that this mutant was cross-resistant to 3TC but not to other NRTIs tested. In a phase II study, elvucitabine demonstrated potent antiviral activity in HIV-infected patients with resistance to 3TC and to others NRTIs, NNRTIs and PIs [234].

As expected from the unnatural L-configuration, *in vitro* studies indicated that elvucitabine was not substrate of the mitochondrial deoxypyrimidine nucleoside kinase and no inhibitory effect was observed on mitochondrial DNA synthesis at concentrations up to 10 mM [235]. In addition, elvucitabine reduced the level of mitochondrial damage caused by d4T when the two drugs were combined. However, preliminary toxicity studies indicated that elvucitabine induced serious, but reversible, bone marrow suppression [234]. Several patients experienced myelosuppression while taking elvucitabine at doses of 50 or 100mg/day and mild headache and gastrointestinal distress were also reported. These studies were halted and experiences with lower doses are expected.

1.4. Racivir, (+/-) 2',3'-dideoxy-3'-thia-5-fluorocytidine, RCV, (+/-)FTC

Racivir is currently in phase II clinical study. This oxathiolane drug is a 50:50 mixture of emtricitabine (-) FTC and its positive enantiomer (+) FTC. Racivir has potent *in vitro* activity against HIV [206; 236] and in a SCID mouse model for HIV, it was more potent than either 3TC or (-) FTC in reducing viral load in blood [237].

In a phase I/II dosing and efficacy study, racivir was administered in combination with d4T and efavirenz [238]. After two weeks, this regimen resulted in a viral load reduction greater than 20-fold and HIV RNA levels remained suppressed for more than two weeks following the end of treatment. There was no evidence that co-administration of d4T and efavirenz had an adverse effect on the pharmacokinetics of racivir [238]. Racivir is currently being studied in HIV infected patients for activity against 3TC resistant mutants. In early studies, single and multiple doses of racivir appear well tolerated with excellent oral bioavailability.

1.5. SPD754 or AVX754, (-)-dOTC, (-)-2'-deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine

SPD754 is in phase II clinical trials under IND status. This compound is the successor to BCH-10652, the racemic mixture of (+) and (-)-d-OTC, which development was suspended in 1999 when severe toxicity was found in monkeys. Activity of SPD754 was tested in a phase IIa trial in HIV-infected treatment-naive patients. SPD754 showed a statistically significant, greater than 25-fold decrease in viral load [239]. Additionally, SPD754 is able to penetrate the cerebrospinal fluid, potentially flushing out hidden pools of the virus from this HIV “sanctuary”.

In test tubes, the drug is active against AZT, 3TC and other NRTIs resistant viruses [240; 241] with a two fold increase in the mean IC_{50} when key mutations at codons 184 and 215 were present [242]. Passaging experiments have shown that resistance is slow to develop *in vitro* in comparison with 3TC, and is associated with K65R, V75I and M184V mutations, causing cross-resistance to 3TC [243]. However, in phase II clinical trials, SPD754 does not select for known mutations associated with resistance to NRTIs [244]. Pharmacokinetic studies indicated that concentrations of SPD754, 3TC, and 3TC-TP were unaffected by co-administration of the two drugs but intracellular SPD754-TP concentrations were reduced approximately 6-fold [245]. This antagonism contraindicates the co-administration of SPD754 with 3TC, but it can be used as second line therapy when 3TC is no longer effective.

Safety profile of SPD754 was studied I In *Cynomolgus* monkeys, the (-) enantiomer SPD754 had a more favourable safety profile and is lacking the serious toxicity seen with the racemate BCH-10652. At 1000mg/kg/day, only minimal mucocutaneous hyperpigmentation, mild gastrointestinal effects and minimal changes in the red blood cell parameters were observed [246]. In humans, SPD754 seems well tolerated at all doses tested and no side effect was reported [247].

1.6. Alovudine, MIV-310, FLT, 3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-thymidine

The nucleoside analogue alovudine, close in structure to AZT, has reached phase II clinical trials. Alovudine is very potent against HIV variants highly resistant to AZT [248; 249]. *In vitro*, alovudine demonstrated good activity against NRTI multi-resistant HIV strains [250]. In addition, a clinical study in individuals with TAMs and detectable viral load showed that adding alovudine at low doses (7.5 mg once daily) was effective in reducing viral loads by over 1 log₁₀ copies/mL. The greatest reduction was seen for individuals who did not receive d4T (1.88 log₁₀). In patients who received concurrent d4T, a smaller reduction was seen (0.54 log₁₀) suggesting that alovudine should not be combined with this NRTI [251; 252].

Side effects of alovudine are related to bone marrow damage, which includes liver toxicity and anemia. Sundseth et al. reported that FLT caused extensive DNA fragmentation and induced apoptosis in CEM cells, providing a possible mechanism for its toxicity [253]. In early clinical trials, the most common side effects reported were anemia and neutropenia. However, no serious side effects were seen in the phase II study.

1.7. DOT, (2R,4R)-4-(thymidin-1-yl)-1,3-dioxolane-2-methanol or (-)-β-D-thymidine dioxolane

DOT, a dioxolane-thymidine nucleoside analogue developed following the discovery of β-D-dioxolane guanosine (DXG) activity, is in phase I clinical trials. . Recent preliminary pharmacokinetic studies indicated that the bioavailability of DOT in monkeys and rats is close to 100% [254]. *In vitro*, DOT is active against WT HIV-1 and it is the first thymidine kinase-activated nucleoside that is significantly active against all of the commonly found NRTI-resistant HIV-1 mutants [255; 256]. DOT was found to be highly active against strains carrying the mutations D67N/K70R/T215Y/K219Q, K65R and M184V [257]. According to molecular modelling studies on DXG and DOT [214; 215], it seems that the functional 3'-oxygen atom of dioxolane moiety plays a significant role by mimicking the 3'-OH group of the natural substrate and stabilizing binding between the mutant M184V RT and the incoming dNTP.

1.8. MIV-210 prodrug of FLG, 2',3'-dideoxy-3'-fluoro-β-D-guanosine

MIV-210 is in phase I clinical trials. When administered to healthy volunteers, it demonstrated a very good oral bioavailability and achieved high blood plasma levels of FLG ([258]).

In cell culture, MIV-210 retains activity against HIV resistant to all anti-HIV agents in the clinic, including 3TC [258; 259]. Its activity against variants with TAMs was the same as against WT viruses. However, it was not effective against viruses with the Q151M mutation or T69S double insertions. Two variants, with modifications at positions 35 and 133, emerged from *in vitro* resistance induction studies. These mutants were resistant to MIV-210, and cross-resistant to 3TC, but not to AZT.

1.9. KP1461 prodrug of KP1212, 5,6-dihydro-5-aza-2'-deoxycytidine

KP1461, a 2'-deoxy-5-azacytidine analogue with a non-planar heterocyclic base, is currently under phase I clinical trials.. Contrary to the others NRTIs (approved or under development), KP1212 does not inhibit HIV replication by blocking proviral DNA synthesis. This compound uses a different strategy and treats viral infections through lethal mutagenesis, an approach first developed by Drs. Loeb and Mullins [260] (see below). KP-1212 is incorporated randomly into the replicating viral genome, and increases the mutation rate of HIV by mispairing, resulting in defective viruses. This compound seems to have the appropriate safety and efficacy profiles to be used as an anti-HIV-1 agent, with an EC₅₀ of 10 nM and CC₅₀ ≥ 1 mM. There was no evidence of cross-resistance with HIV strains resistant to approved drugs or evidence of development of new resistant strains when using KP1212. Additionally, HIV strains treated with KP1212 show increased sensitivity toward KP1212 itself and AZT [261].

During the phase Ia trial no consistent toxicity was noted. In addition, KP1212 does not increase the mutation frequency of a cellular gene (*hgp*rt) in Chinese hamster ovary cells and male lymphoblasts, and it does not demonstrate evidence of significant genotoxicity or mitochondrial toxicity [261; 262]. However, a recent study suggested that even if exonucleases are able to remove KP1212 from cellular DNA, it may possibly present mitochondrial toxicity [263].

2. New classes of anti-HIV nucleoside analogues

With the emergence of HIV strains resistant and/or cross-resistant to nearly all anti-retroviral regimens (NRTIs, NNRTIs and PIs) novel therapy approaches have to be

considered. In our opinion, two interesting strategies have been reported in the field of anti-HIV nucleoside analogues: the delayed polymerization arrest and the selective viral mutagenesis.

2.1. Delayed polymerization arrest

In the context of the resistance to NRTIs described above, the development of nucleoside analogues without modification of the 3' position of the ribose that are able to induce delayed polymerization arrest is quite attractive. As the compounds are very different from all FDA-approved NRTIs, little cross-resistance is expected. In addition, as they are not immediate chain terminators, they should be protected from phosphorolytic excision, which eliminates only the last nucleotide incorporated (Figure 5).

Several years ago, nucleoside analogues with a 3'-OH unmodified function were reported. Maag *et al.* [264] described 4'-azido-thymidine (4'-AZT) as a potent anti-HIV-1 agent *in vitro*, and Sugimoto [265], Kodama [266] and their co-workers reported a series of 4'-ethynyl-2'-deoxynucleosides with activity against WT and multidrug-resistant HIV-1 strains and HIV-2. Even though the exact mechanism of action of these compounds has not yet been elucidated, several experiments strongly suggested that 4'-ethynyl-nucleoside analogues belong to the family of NRTI [266]. In addition, Cheng *et al.* [267] reported that viral DNA chain elongation is blocked after the incorporation of two consecutive 4'-AZT-MP molecules or two 4-AZT-MP separated by one natural 2'-deoxynucleoside-MP, possibly because of the structural distortion of the growing primer.

Toxicity studies indicated that 4'-substituted nucleosides are generally poor substrates for cellular DNA polymerases [266]. However, polymerases α and β incorporate a single 4'-AZT-MP molecule in host cell DNA without any effect on DNA elongation [267]. We can therefore suspect that this compound may produce long-term toxicity even if immediate cytotoxic effects are not detected.

In our opinion, 4'-substituted-2'-deoxy-nucleoside analogues are the precursors of a promising new class of anti-HIV agents: the delayed chain terminators. As all first generation molecules, they need improvements, particularly in their toxicity profiles, but they can lead to interesting progresses in anti-HIV therapy.

It should be noted that some FDA-approved drugs targeting other viruses than HIV act by a mechanism of delayed termination. This is the case for the anti-VZV DNA polymerase inhibitor Brivudin (BVDU) and the broad-spectrum anti-DNA virus DNA polymerase inhibitor Cidofovir (HPMPC) ([268]): BVDU is incorporated internally in the growing DNA

chain thus leading to a reduced integrity and functioning of viral DNA and HPMPC creates distortions in the nascent DNA following two consecutive incorporations.

Recently, Boyer and colleagues opted for another strategy to induce delayed chain termination. Close to the catalytic site, the DNA duplex is in the A form and the sugar moiety of the nucleotides is in the north (N) conformation [4; 269]. The incoming nucleotide also adopts the N conformation [4]. However, 6-7 nucleotides from the polymerase site, the DNA duplex undergoes a transition toward the B form, and the sugar rings of the nucleotides adopt the south (S) conformation [4; 269]. Thus, Boyer *et al.* [270] synthesized methanocarpa-2'-deoxynucleosides locked in the N or S conformation. The N-locked nucleoside analogues were efficiently incorporated by RT and induced delayed chain termination, while the S-locked nucleoside analogues did not [270]. However, there is a drawback inherent to this strategy, since cellular kinases, unlike DNA polymerase, have a strong preference for substrates in the S conformation. Therefore, the N-locked methanocarpa-2'-deoxynucleosides displayed anti-HIV activity only in cells expressing the thymidine kinase from the herpes simplex virus, which has a relaxed specificity [270].

2.1. Selective Viral Mutagenesis (SVM) or Lethal Mutagenesis

In infected individuals, HIV mutates at a very high rate, approximately a million times greater than cellular DNA genome. While this genetic diversity allows viral subpopulations to escape conventional antiviral therapies, most of these mutations are probably lethal or crippling, which explains why most viral particles are not infectious.

Selective viral mutagenesis (SVM) or lethal mutagenesis [262; 271; 272] relies on the poor fidelity of HIV-1 RT. Rather than causing chain termination and attempting to immediately halt viral replication, as with conventional NRTIs, the purpose of SVM agents is to be incorporated into the viral genome during replication and, by mispairing, to introduce mutations into the HIV genome to the point where the virus cannot further replicate [273]. The slight increase in mutations affects all viral proteins and cumulatively, over a number of replication cycles, is lethal to the virus. Since host cells DNA polymerization is quite faithful, with DNA repair processes able to eliminate errors in double stranded DNA, the cellular toxicity should be minimal. DNA mutagenic nucleosides are currently being screened for activity against HIV, but they may have activity against hepatitis B and smallpox virus as well. In addition, there are some evidences that the anti-HCV drug Ribavirin is an RNA virus mutagen [274-276].

Loeb and Mullins [260] initially tested the hypothesis of lethal mutagenesis by culturing HIV-infected cells in the presence of several mutagenic deoxyribonucleoside analogues. In the presence of 5-hydroxy-deoxycytidine (Figure 6a), they noted a sudden and dramatic loss of viral replication after sequential passages of HIV in human CEM cells. However, the concentration of 5-OH-dC required for abolition of viral infection (0.5 to 1.0 mM) was likely to be prohibitive and other mutagenic nucleosides were screened. More recently, Koronis Pharmaceuticals reported a novel SVM nucleoside with the appropriate safety and efficacy profiles, KP1212 (Figure 6b) KP1212 and its prodrug KP1461 have the requisites for a new generation of antiretroviral drugs, including lack of cross-resistance with HIV strains resistant to approved drugs. This promising compound is under phase I clinical trials (see above).

CONCLUSIONS

NRTIs are one of the major classes of inhibitors used in all combination therapies for the treatment of HIV-1 infected patients. Even though the current inhibitors considerably slow down the progression of the disease, selection of drug-resistant viral strains can cause drug failure. Considerable progress has been made in understanding the mechanisms of resistance of HIV-1 RT toward NRTIs at the molecular level. This knowledge is essential for several purposes. It allows the best combination of drugs to be selected, both to avoid antagonist effects, and to take advantage of synergistic activities. It is also crucial for the design of new compounds with better toxicity profiles and which can target resistant viruses. To this end, new nucleoside analogues are being developed, some of which are already in clinical trials. In addition, new strategies for inhibiting HIV-1 with nucleotide analogues are investigated. Some nucleoside analogues possessing a 3' hydroxyl group induce "delayed" polymerisation arrest. These compounds are very different from all FDA-approved NRTIs, therefore little cross-resistance is expected. In addition, as they are not immediate chain terminators, they should be immune from phosphorolytic excision. A second new class of NRTIs is designed to be incorporated into the viral genome during replication and, by mispairing, introduce mutations into the HIV genome to the point where the virus cannot further replicate. This strategy of "lethal mutagenesis" should be favourable in terms of cellular toxicity since host cells DNA polymerases possesses proofreading activities. One such compound is currently under phase I clinical trial.

1. Barre-Sinoussi, F., Cherman, J. C., Rey, F., Nugeyre, H. T., Charmet, S., Gruest, J., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
2. Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-7.
3. Skalka, A. M. and Goff, S. P., Eds. (1993). Reverse Transcriptase. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. and Harrison, S. (1998). Structure of covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282, 1669-1675.
5. Jacobo-Molina, A., Ding, J. P., Nanni, R. G., Clark, A. D., Lu, X. D., Tantillo, C., et al. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase complexed with Double-Stranded DNA at 3.0 angstrom resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6320-6324.
6. Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. and Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3,5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783-1790.
7. Wild, C., Greenwell, T. and Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 1051-3.
8. Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. and Matthews, T. J. (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9770-4.
9. Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. and Johnson, K. A. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267, 988-993.
10. Esnouf, R., Ren, J. S., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. and Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature Struct Biology* 2, 303-308.
11. Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., et al. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7096-7100.
12. Dahlberg, J. E., Mitsuya, H., Blam, S. B., Broder, S. and Aaronson, S. A. (1987). Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2469-2473.
13. Kim, C. H., Marquez, V. E., Broder, S., Mitsuya, H. and Driscoll, J. S. (1987). Potential anti-AIDS drugs. 2',3'-Dideoxycytidine analogues. *J Med Chem* 30, 862-6.
14. Balzarini, J., Herdewijn, P. and De Clercq, E. (1989). Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem* 264, 6127-6133.

15. Furman, P. A., Fyfe, J. A., St Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., et al. (1986). Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8333-8337.
16. Eisenberg, E. J., He, G. X. and Lee, W. A. (2001). Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20, 1091-1098.
17. Johnson, M. A. and Fridland, A. (1989). Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol Pharmacol* 36, 291-5.
18. Ray, A. S., Yang, Z., Shi, J., Hobbs, A., Schinazi, R. F., Chu, C. K., et al. (2002). Insights into the molecular mechanism of inhibition and drug resistance for HIV-1 RT with carbovir triphosphate. *Biochemistry* 41, 5150-62.
19. Lavie, A., Schlichting, I., Vetter, I. R., Konrad, M., Reinstein, J. and Goody, R. S. (1997). The bottleneck in AZT activation. *Nat Med* 3, 922-4.
20. Lavie, A., Vetter, I. R., Konrad, M., Goody, R. S., Reinstein, J. and Schlichting, I. (1997). Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat Struct Biol* 4, 601-4.
21. Schneider, B., Xu, Y. W., Sellam, O., Sarfati, R., Janin, J., Veron, M., et al. (1998). Pre-steady state of reaction of nucleoside diphosphate kinase with anti-HIV nucleotides. *J Biol Chem* 273, 11491-7.
22. Shafer, R. W. (2002). Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 15, 247-77.
23. Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Korber, B., Marx, P., McCutchan, F., et al., Eds. (2003). HIV Sequence Compendium 2003.
24. Roberts, J. D., Bebenek, K. and Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171-1173.
25. Preston, B. D., Poiesz, B. J. and Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242, 1168-1171.
26. Rezende, L. F. and Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1716-34.
27. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. and Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582-1586.
28. Kellam, P. and Larder, B. A. (1995). Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol* 69, 669-674.
29. Moutouh, L., Corbeil, J. and Richman, D. D. (1996). Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6106-11.
30. Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267, 483-9.
31. Larder, B. A., Darby, G. and Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243, 1731-1734.
32. Richman, D. D. (1990). Susceptibility to nucleoside analogues of zidovudine-resistant isolates of human immunodeficiency virus. *Am J Med* 88, 8S-10S.
33. Kellam, P., Boucher, C. A. and Larder, B. A. (1992). Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1934-8.

34. Hooker, D. J., Tachedjian, G., Solomon, A. E., Gurusinghe, A. D., Land, S., Birch, C., et al. (1996). An in vivo mutation from leucine to tryptophan at position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Virol* 70, 8010-8.
35. Larder, B. A. and Kemp, S. D. (1989). Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246, 1155-1158.
36. Richman, D. D., Guatelli, J. C., Grimes, J., Tsiatis, A. and Gingeras, T. (1991). Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 164, 1075-81.
37. Boucher, C. A., O'Sullivan, E., Mulder, J. W., Ramautarsing, C., Kellam, P., Darby, G., et al. (1992). Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* 165, 105-10.
38. Larder, B. A., Coates, K. E. and Kemp, S. D. (1991). Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J Virol* 65, 5232-6.
39. Gao, Q., Gu, Z. X., Parniak, M. A., Li, X. G. and Wainberg, M. A. (1992). In vitro selection of variants of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine. *J Virol* 66, 12-9.
40. Pellegrin, I., Izopet, J., Reynes, J., Denayrolles, M., Montes, B., Pellegrin, J. L., et al. (1999). Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *Aids* 13, 1705-9.
41. Izopet, J., Bicart-See, A., Pasquier, C., Sandres, K., Bonnet, E., Marchou, B., et al. (1999). Mutations conferring resistance to zidovudine diminish the antiviral effect of stavudine plus didanosine. *J Med Virol* 59, 507-11.
42. Lin, P. F., Samanta, H., Rose, R. E., Patick, A. K., Trimble, J., Bechtold, C. M., et al. (1994). Genotypic and phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients on prolonged stavudine therapy. *J Infect Dis* 170, 1157-64.
43. de Ronde, A., van Dooren, M., de Rooij, E., van Gemen, B., Lange, J. and Goudsmit, J. (2000). Infection by zidovudine-resistant HIV-1 compromises the virological response to stavudine in a drug-naive patient. *Aids* 14, 2632-3.
44. Coakley, E. P., Gillis, J. M. and Hammer, S. M. (2000). Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *Aids* 14, F9-15.
45. Kozal, M. J., Shafer, R. W., Winters, M. A., Katzenstein, D. A. and Merigan, T. C. (1993). A mutation in human immunodeficiency virus reverse transcriptase and decline in CD4 lymphocyte numbers in long-term zidovudine recipients. *J Infect Dis* 167, 526-32.
46. Shafer, R. W., Iversen, A. K., Winters, M. A., Aguiniga, E., Katzenstein, D. A. and Merigan, T. C. (1995). Drug resistance and heterogeneous long-term virologic responses of human immunodeficiency virus type 1-infected subjects to zidovudine and didanosine combination therapy. The AIDS Clinical Trials Group 143 Virology Team. *J Infect Dis* 172, 70-8.
47. Demeter, L. M., Nawaz, T., Morse, G., Dolin, R., Dexter, A., Gerondelis, P., et al. (1995). Development of zidovudine resistance mutations in patients receiving prolonged didanosine monotherapy. *J Infect Dis* 172, 1480-5.
48. Winters, M. A., Shafer, R. W., Jellinger, R. A., Mamtora, G., Gingeras, T. and Merigan, T. C. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase

- genotype and drug susceptibility changes in infected individuals receiving dideoxyinosine monotherapy for 1 to 2 years. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 757-62.
49. Lacey, S. F. and Larder, B. A. (1994). Mutagenic study of codons 74 and 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, which are significant in nucleoside analog resistance. *J Virol* 68, 3421-4.
 50. Larder, B. A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* 75 (Pt 5), 951-7.
 51. Boucher, C. A., Cammack, N., Schipper, P., Schuurman, R., Rouse, P., Wainberg, M. A., et al. (1993). High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2231-4.
 52. Gonzales, M. J., Wu, T. D., Taylor, J., Belitskaya, I., Kantor, R., Israelski, D., et al. (2003). Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors. *Aids* 17, 791-9.
 53. Miller, V. and Larder, B. A. (2001). Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir Ther* 6 Suppl 3, 25-44.
 54. Wainberg, M. A. and White, A. J. (2001). Current insights into reverse transcriptase inhibitor-associated resistance. *Antivir Ther* 6 Suppl 2, 11-9.
 55. Whitcomb, J. M., Parkin, N. T., Chappey, C., Hellmann, N. S. and Petropoulos, C. J. (2003). Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* 188, 992-1000.
 56. Harrigan, P. R., Stone, C., Griffin, P., Najera, I., Bloor, S., Kemp, S., et al. (2000). Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J Infect Dis* 181, 912-20.
 57. Lennerstrand, J., Stammers, D. K. and Larder, B. A. (2001). Biochemical mechanism of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistance to stavudine. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2144-6.
 58. Shulman, N. S., Hughes, M. D., Winters, M. A., Shafer, R. W., Zolopa, A. R., Hellmann, N. S., et al. (2002). Subtle decreases in stavudine phenotypic susceptibility predict poor virologic response to stavudine monotherapy in zidovudine-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31, 121-7.
 59. Larder, B. A. and Bloor, S. (2001). Analysis of clinical isolates and site-directed mutants reveal the genetic determinants of didanosine resistance. *Antiviral Therapy* 6.
 60. Wainberg, M. A., Miller, M. D., Quan, Y., Salomon, H., Mulato, A. S., Lamy, P. D., et al. (1999). In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA. *Antivir Ther* 4, 87-94.
 61. Miller, M. D., Margot, N. A., Hertogs, K., Larder, B. and Miller, V. (2001). Antiviral activity of tenofovir (PMPA) against nucleoside-resistant clinical HIV samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20, 1025-8.
 62. Margot, N. A., Isaacson, E., McGowan, I., Cheng, A. K., Schooley, R. T. and Miller, M. D. (2002). Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral-experienced patients treated with tenofovir DF. *Aids* 16, 1227-35.
 63. Wolf, K., Walter, H., Beerenwinkel, N., Keulen, W., Kaiser, R., Hoffmann, D., et al. (2003). Tenofovir resistance and resensitization. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3478-84.

64. Hirsch, M., Steigbigel, R., Staszewski, S., Mellors, J., Scerpella, E., Hirschel, B., et al. (1999). A randomized, controlled trial of indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with advanced human immunodeficiency virus type 1 infection and prior antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 180, 659-65.
65. Delfraissy, P. J. F., Ed. (2004). *Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH-1*. Medecine-Sciences Flammarion edit: Ministère de la santé et de la protection sociale/ANRS.
66. Gao, Q., Gu, Z., Hiscott, J., Dionne, G. and Wainberg, M. A. (1993). Generation of drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1 by in vitro passage in increasing concentrations of 2',3'-dideoxycytidine and 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 130-3.
67. Schinazi, R. F., Lloyd, R. M., Jr., Nguyen, M. H., Cannon, D. L., McMillan, A., Ilksoy, N., et al. (1993). Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 875-81.
68. Tisdale, M., Kemp, S. D., Parry, N. R. and Larder, B. A. (1993). Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5653-6.
69. Keulen, W., Back, N. K., van Wijk, A., Boucher, C. A. and Berkhout, B. (1997). Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* 71, 3346-50.
70. Wainberg, M. A., Salomon, H., Gu, Z., Montaner, J. S., Cooley, T. P., McCaffrey, R., et al. (1995). Development of HIV-1 resistance to (-)2'-deoxy-3'-thiacytidine in patients with AIDS or advanced AIDS-related complex. *Aids* 9, 351-7.
71. Schuurman, R., Nijhuis, M., van Leeuwen, R., Schipper, P., de Jong, D., Collis, P., et al. (1995). Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* 171, 1411-9.
72. Kavlick, M. F., Shirasaka, T., Kojima, E., Pluda, J. M., Hui, F., Jr., Yarchoan, R., et al. (1995). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolated from patients receiving (-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antiviral Res* 28, 133-46.
73. Frost, S. D., Nijhuis, M., Schuurman, R., Boucher, C. A. and Brown, A. J. (2000). Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J Virol* 74, 6262-8.
74. Miller, V., Ait-Khaled, M., Stone, C., Griffin, P., Mesogiti, D., Cutrell, A., et al. (2000). HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *Aids* 14, 163-71.
75. St Clair, M. H., Martin, J. L., Tudor-Williams, G., Bach, M. C., Vavro, C. L., King, D. M., et al. (1991). Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 253, 1557-9.
76. Kozal, M. J., Kroodsma, K., Winters, M. A., Shafer, R. W., Efron, B., Katzenstein, D. A., et al. (1994). Didanosine resistance in HIV-infected patients switched from zidovudine to didanosine monotherapy. *Ann Intern Med* 121, 263-8.
77. Tisdale, M., Alnadaf, T. and Cousens, D. (1997). Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1094-8.

78. Martin, J. L., Wilson, J. E., Haynes, R. L. and Furman, P. A. (1993). Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6135-9.
79. Molina, J. M., Marcelin, A. G., J., P., C., M., M., T., G., L., et al. (2003). *43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Chicago.*
80. Zhang, D., Caliendo, A. M., Eron, J. J., DeVore, K. M., Kaplan, J. C., Hirsch, M. S., et al. (1994). Resistance to 2',3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 282-7.
81. Gu, Z., Fletcher, R. S., Arts, E. J., Wainberg, M. A. and Parniak, M. A. (1994). The K65R mutant reverse transcriptase of HIV-1 cross-resistant to 2', 3'-dideoxycytidine, 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, and 2',3'-dideoxyinosine shows reduced sensitivity to specific dideoxynucleoside triphosphate inhibitors in vitro. *J Biol Chem* 269, 28118-22.
82. Miller, M. D., Margot, N. A. and Lu, B. (2002). *9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections., Seattle.*
83. Garcia-Lerma, J. G., MacInnes, H., Bennett, D., Reid, P., Nidtha, S., Weinstock, H., et al. (2003). A Novel Genetic Pathway of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Stavudine Mediated by the K65R Mutation. *J Virol* 77, 5685-5693.
84. Roge, B. T., Katzenstein, T. L., Obel, N., Nielsen, H., Kirk, O., Pedersen, C., et al. (2003). K65R with and without S68: a new resistance profile in vivo detected in most patients failing abacavir, didanosine and stavudine. *Antivir Ther* 8, 173-82.
85. Farthing, C., Khanlou, H. and Yeh, V. (2003). *Conference on HIV Pathogenesis and Treatment., Paris.*
86. Gallant, J., Rodriguez, A. and Weinberg, W. (2003). *43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago.*
87. Gu, Z., Gao, Q., Li, X., Parniak, M. A. and Wainberg, M. A. (1992). Novel mutation in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine. *J Virol* 66, 7128-35.
88. Gu, Z., Gao, Q., Fang, H., Salomon, H., Parniak, M. A., Goldberg, E., et al. (1994). Identification of a mutation at codon 65 in the IKKK motif of reverse transcriptase that encodes human immunodeficiency virus resistance to 2',3'-dideoxycytidine and 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 275-81.
89. Bazmi, H. Z., Hammond, J. L., Cavalcanti, S. C., Chu, C. K., Schinazi, R. F. and Mellors, J. W. (2000). In vitro selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (-)-beta-D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1783-8.
90. Srinivas, R. V. and Fridland, A. (1998). Antiviral activities of 9-R-2-phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1484-7.
91. Fitzgibbon, J. E., Howell, R. M., Haberzettl, C. A., Sperber, S. J., Gocke, D. J. and Dubin, D. T. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 pol gene mutations which cause decreased susceptibility to 2',3'-dideoxycytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 153-7.
92. Imamichi, T., Sinha, T., Imamichi, H., Zhang, Y. M., Metcalf, J. A., Falloon, J., et al. (2000). High-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine due to a deletion in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74, 1023-8.

93. Bloor, S., Hertogs, K., Larder, B., Pauwels, R. and Larder, B. A. (1998). Virological basis for HIV-1 resistance to stavudine investigated by analysis of clinical samples. *Antivir Ther 3 (Suppl 1)*, 15-16.
94. Hertogs, K., de Bethune, M. P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., Van Cauwenberge, A., et al. (1998). A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 269-76.
95. Miller, M. D., Anton, K. E., Mulato, A. S., Lamy, P. D. and Cherrington, J. M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 expressing the lamivudine-associated M184V mutation in reverse transcriptase shows increased susceptibility to adefovir and decreased replication capability in vitro. *J Infect Dis* 179, 92-100.
96. Winters, M. A. and Merigan, T. C. (2001). Variants other than aspartic acid at codon 69 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene affect susceptibility to nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2276-9.
97. Van Vaerenbergh, K., Van Laethem, K., Albert, J., Boucher, C. A., Clotet, B., Florida, M., et al. (2000). Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2109-17.
98. Larder, B. A., Bloor, S., Kemp, S. D., Hertogs, K., Desmet, R. L., Miller, V., et al. (1999). A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1961-7.
99. Winters, M. A., Coolley, K. L., Girard, Y. A., Levee, D. J., Hamdan, H., Shafer, R. W., et al. (1998). A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* 102, 1769-75.
100. de Jong, J. J., Goudsmit, J., Lukashov, V. V., Hillebrand, M. E., Baan, E., Huismans, R., et al. (1999). Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *Aids* 13, 75-80.
101. Tamalet, C., Yahi, N., Tourres, C., Colson, P., Quinson, A. M., Poizot-Martin, I., et al. (2000). Multidrug resistance genotypes (insertions in the beta3-beta4 finger subdomain and MDR mutations) of HIV-1 reverse transcriptase from extensively treated patients: incidence and association with other resistance mutations. *Virology* 270, 310-6.
102. Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., et al. (2001). Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1836-42.
103. Brun-Vezinet, F., Descamps, D., Ruffault, A., Masquelier, B., Calvez, V., Peytavin, G., et al. (2003). Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *Aids* 17, 1795-802.
104. Ross, L., Scarsella, A., Raffanti, S., Henry, K., Becker, S., Fisher, R., et al. (2001). Thymidine analog and multinucleoside resistance mutations are associated with decreased phenotypic susceptibility to stavudine in HIV type 1 isolated from zidovudine-naive patients experiencing viremia on stavudine-containing regimens. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1107-15.

105. Goldschmidt, V. and Marquet, R. (2004). Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1687-705.
106. Deval, J., Courcambeck, J., Selmi, B., Boretto, J. and Canard, B. (2004). Structural determinants and molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. *Curr Drug Metab* 5, 305-16.
107. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. and Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282, 1669-1675.
108. Sarafianos, S. G., Das, K., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H., et al. (1999). Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10027-32.
109. Feng, J. Y. and Anderson, K. S. (1999). Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 38, 9440-8.
110. Krebs, R., Immendorfer, U., Thrall, S. H., Wohrl, B. M. and Goody, R. S. (1997). Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-TC. *Biochemistry* 36, 10292-300.
111. Wilson, J. E., Aulabaugh, A., Caligan, B., McPherson, S., Wakefield, J. K., Jablonski, S., et al. (1996). Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. Contribution of Met-184 to binding of nucleoside 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 271, 13656-62.
112. Drosopoulos, W. C. and Prasad, V. R. (1996). Increased polymerase fidelity of E89G, a nucleoside analog-resistant variant of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* 70, 4834-8.
113. Pandey, V. N., Kaushik, N., Rege, N., Sarafianos, S. G., Yadav, P. N. and Modak, M. J. (1996). Role of methionine 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in the polymerase function and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry* 35, 2168-79.
114. Wainberg, M. A., Drosopoulos, W. C., Salomon, H., Hsu, M., Borkow, G., Parniak, M., et al. (1996). Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 271, 1282-5.
115. Oude Essink, B. B., Back, N. K. and Berkhout, B. (1997). Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* 25, 3212-7.
116. Back, N. K., Nijhuis, M., Keulen, W., Boucher, C. A., Oude Essink, B. O., van Kuilenburg, A. B., et al. (1996). Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *Embo J* 15, 4040-9.
117. Larder, B. A., Kemp, S. D. and Harrigan, P. R. (1995). Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269, 696-9.
118. Brenner, B. G., Routy, J. P., Petrella, M., Moisi, D., Oliveira, M., Detorio, M., et al. (2002). Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 76, 1753-61.
119. Bouchonnet, F., Dam, E., Mammano, F., de Soultrait, V., Hennere, G., Benech, H., et al. (2005). Quantification of the effects on viral DNA synthesis of reverse transcriptase mutations conferring human immunodeficiency virus type 1 resistance to nucleoside analogues. *J Virol* 79, 812-22.

120. Wainberg, M. A. (2004). The impact of the M184V substitution on drug resistance and viral fitness. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2, 147-51.
121. Diallo, K., Marchand, B., Wei, X., Cellai, L., Gotte, M. and Wainberg, M. A. (2003). Diminished RNA primer usage associated with the L74V and M184V mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 provides a possible mechanism for diminished viral replication capacity. *J Virol* 77, 8621-32.
122. Sharma, P. L. and Crumpacker, C. S. (1997). Attenuated replication of human immunodeficiency virus type 1 with a didanosine-selected reverse transcriptase mutation. *J Virol* 71, 8846-51.
123. Sharma, P. L. and Crumpacker, C. S. (1999). Decreased processivity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) containing didanosine-selected mutation Leu74Val: a comparative analysis of RT variants Leu74Val and lamivudine-selected Met184Val. *J Virol* 73, 8448-56.
124. Rubinek, T., Bakhanashvili, M., Taube, R., Avidan, O. and Hizi, A. (1997). The fidelity of 3' misinsertion and mispair extension during DNA synthesis exhibited by two drug-resistant mutants of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 with Leu74-->Val and Glu89-->Gly. *Eur J Biochem* 247, 238-47.
125. Frankel, F. A., Marchand, B., Turner, D., Gotte, M. and Wainberg, M. A. (2005). Impaired Rescue of Chain-Terminated DNA Synthesis Associated with the L74V Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2657-64.
126. Miranda, L. R., Gotte, M. and Kuritzkes, D. R. (2005). The L74V Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Counteracts Enhanced Excision of Zidovudine Monophosphate Associated with Thymidine Analog Resistance Mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2648-56.
127. Arion, D., Borkow, G., Gu, Z., Wainberg, M. A. and Parniak, M. A. (1996). The K65R mutation confers increased DNA polymerase processivity to HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 271, 19860-4.
128. White, K. L., Margot, N. A., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Miller, M. D. and Naeger, L. K. (2002). Molecular mechanisms of resistance to human immunodeficiency virus type 1 with reverse transcriptase mutations K65R and K65R+M184V and their effects on enzyme function and viral replication capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3437-46.
129. Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S. R., Guerreiro, C. and Canard, B. (2001). Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an alpha-boranophosphate nucleoside analogue. *J Biol Chem* 276, 48466-72.
130. Shah, F. S., Curr, K. A., Hamburg, M. E., Parniak, M., Mitsuya, H., Arnez, J. G., et al. (2000). Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 275, 27037-44.
131. Lanier, E., Irlbeck, D., Ross, L., Gerondelis, P., Underwood, M., Parkin, N., et al. (2003). *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston*.
132. Rhee, S. Y., Gonzales, M. J., Kantor, R., Betts, B. J., Ravela, J. and Shafer, R. W. (2003). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 31, 298-303.
133. Deval, J., White, K. L., Miller, M. D., Parkin, N. T., Courcambek, J., Halfon, P., et al. (2004). Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. *J Biol Chem* 279, 509-16.

134. Deval, J., Navarro, J. M., Selmi, B., Courcambeck, J., Boretto, J., Halfon, P., et al. (2004). A loss of viral replicative capacity correlates with altered DNA polymerization kinetics by the human immunodeficiency virus reverse transcriptase bearing the K65R and L74V dideoxynucleoside resistance substitutions. *J Biol Chem* 279, 25489-96.
135. Kerr, S. G. and Anderson, K. S. (1997). Pre-steady-state kinetic characterization of wild type and 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: implication of RNA directed DNA polymerization in the mechanism of AZT resistance. *Biochemistry* 36, 14064-70.
136. Lacey, S. F., Reardon, J. E., Furfine, E. S., Kunkel, T. A., Bebenek, K., Eckert, K. A., et al. (1992). Biochemical studies on the reverse transcriptase and RNase H activities from human immunodeficiency virus strains resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Biol Chem* 267, 15789-94.
137. Kim, B. and Loeb, L. A. (1995). A screen in *Escherichia coli* for nucleoside analogs that target human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase: coexpression of HIV reverse transcriptase and herpes simplex virus thymidine kinase. *J Virol* 69, 6563-6.
138. Hsieh, J. C., Zinnen, S. and Modrich, P. (1993). Kinetic mechanism of the DNA-dependent DNA polymerase activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem* 268, 24607-13.
139. Reardon, J. E. (1993). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. A kinetic analysis of RNA-dependent and DNA-dependent DNA polymerization. *J Biol Chem* 268, 8743-51.
140. Canard, B., Sarfati, S. R. and Richardson, C. C. (1998). Enhanced binding of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase to the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem* 273, 14596-604.
141. Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G. and Parniak, M. A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* 37, 15908-17.
142. Arion, D., Sluis-Cremer, N. and Parniak, M. A. (2000). Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 275, 9251-5.
143. Gotte, M., Arion, D., Parniak, M. A. and Wainberg, M. A. (2000). The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol* 74, 3579-85.
144. Carroll, S. S., Geib, J., Olsen, D. B., Stahlhut, M., Shafer, J. A. and Kuo, L. C. (1994). Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by azidothymidine triphosphate. *Biochemistry* 33, 2113-20.
145. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Mian, A. M., So, A. G. and Scott, W. A. (1999). A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* 4, 35-43.
146. Lennerstrand, J., Hertogs, K., Stammers, D. K. and Larder, B. A. (2001). Correlation between viral resistance to zidovudine and resistance at the reverse transcriptase level for a panel of human immunodeficiency virus type 1 mutants. *J Virol* 75, 7202-5.
147. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Tolun, A. A., Pfeifer, I., So, A. G., Mellors, J. W., et al. (2002). Effects of specific zidovudine resistance mutations and substrate structure on nucleotide-dependent primer unblocking by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1540-5.

148. Smith, A. J., Meyer, P. R., Asthana, D., Ashman, M. R. and Scott, W. A. (2005). Intracellular substrates for the primer-unblocking reaction by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: detection and quantitation in extracts from quiescent- and activated-lymphocyte subpopulations. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1761-9.
149. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G. and Scott, W. A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13471-6.
150. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Schinazi, R. F., So, A. G. and Scott, W. A. (2000). Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3465-72.
151. Ray, A. S., Murakami, E., Basavapathruni, A., Vaccaro, J. A., Ulrich, D., Chu, C. K., et al. (2003). Probing the molecular mechanisms of AZT drug resistance mediated by HIV-1 reverse transcriptase using a transient kinetic analysis. *Biochemistry* 42, 8831-41.
152. Naeger, L. K., Margot, N. A. and Miller, M. D. (2002). ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2179-84.
153. Isel, C., Ehresmann, C., Walter, P., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2001). The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 276, 48725-32.
154. Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. and Hughes, S. H. (2001). Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 75, 4832-42.
155. Ding, J., Hughes, S. H. and Arnold, E. (1997). Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* 44, 125-138.
156. Marchand, B. and Gotte, M. (2003). Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J Biol Chem*, in press.
157. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P., et al. (2002). Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *Embo J* 21, 6614-24.
158. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Tuske, S., Squire, C. J., Das, K., Sheng, D., et al. (2003). Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA. *J Biol Chem* 278, 16280-16288.
159. Sluis-Cremer, N., Arion, D., Parikh, U., Koontz, D., Schinazi, R. F., Mellors, J. W., et al. (2005). The 3'-Azido Group Is Not the Primary Determinant of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) Responsible for the Excision Phenotype of AZT-resistant HIV-1. *J Biol Chem* 280, 29047-52.
160. Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. and Hughes, S. H. (2002). The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76, 3248-56.
161. Matamoros, T., Franco, S., Vazquez-Alvarez, B. M., Mas, A., Martinez, M. A. and Menendez-Arias, L. (2004). Molecular determinants of multi-nucleoside analogue resistance in HIV-1 reverse transcriptases containing a dipeptide insertion in the

- fingers subdomain: effect of mutations D67N and T215Y on removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA primers. *J Biol Chem* 279, 24569-77.
162. Chamberlain, P. P., Ren, J., Nichols, C. E., Douglas, L., Lennerstrand, J., Larder, B. A., et al. (2002). Crystal structures of Zidovudine- or Lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases containing mutations at codons 41, 184, and 215. *J Virol* 76, 10015-9.
 163. Rigourd, M., Lanchy, J. M., Le Grice, S. F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (2000). Inhibition of the initiation of HIV-1 reverse transcription by 3'-azido-3'-deoxythymidine. Comparison with elongation. *J Biol Chem* 275, 26944-51.
 164. Rigourd, M., Ehresmann, C., Parniak, M. A., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2002). Primer unblocking and rescue of DNA synthesis by azidothymidine (AZT)-resistant HIV-1 reverse transcriptase: comparison between initiation and elongation of reverse transcription and between (-) and (+) strand DNA synthesis. *J Biol Chem* 277, 18611-8.
 165. Meyer, P. R., Smith, A. J., Matsuura, S. E. and Scott, W. A. (2004). Effects of primer-template sequence on ATP-dependent removal of chain-terminating nucleotide analogues by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 279, 45389-98.
 166. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Zonarich, D., Chopra, R. R., Pendarvis, E., Bazmi, H. Z., et al. (2003). Relationship between 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance and primer unblocking activity in foscarnet-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* 77, 6127-37.
 167. Meyer, P. R., Lennerstrand, J., Matsuura, S. E., Larder, B. A. and Scott, W. A. (2003). Effects of dipeptide insertions between codons 69 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on primer unblocking, deoxynucleoside triphosphate inhibition, and DNA chain elongation. *J Virol* 77, 3871-7.
 168. Nikolenko, G. N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J. W., Coffin, J. M. and Pathak, V. K. (2005). Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2093-8.
 169. Borkow, G., Arion, D., Wainberg, M. A. and Parniak, M. A. (1999). The thiocarboxanilide nonnucleoside inhibitor UC781 restores antiviral activity of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) against AZT-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 259-63.
 170. Odriozola, L., Cruchaga, C., Andreola, M., Dolle, V., Nguyen, C. H., Tarrago-Litvak, L., et al. (2003). Nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase inhibit phosphorolysis and resensitize the 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-resistant polymerase to AZTTP. *J Biol Chem*, in press.
 171. Basavapathruni, A., Bailey, C. M. and Anderson, K. S. (2004). Defining a molecular mechanism of synergy between nucleoside and nonnucleoside AIDS drugs. *J Biol Chem* 279, 6221-4.
 172. Cruchaga, C., Odriozola, L., Andreola, M., Tarrago-Litvak, L. and Martinez-Irujo, J. J. (2005). Inhibition of phosphorolysis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase is responsible for the synergy found in combinations of 3'-azido-3'-deoxythymidine with nonnucleoside inhibitors. *Biochemistry* 44, 3535-46.
 173. Richman, D., Shih, C. K., Lowy, I., Rose, J., Prodanovich, P., Goff, S., et al. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors of reverse transcriptase arise in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11241-5.
 174. Larder, B. A. (1992). 3'-Azido-3'-deoxythymidine resistance suppressed by a mutation conferring human immunodeficiency virus type 1 resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 2664-9.

175. Selmi, B., Deval, J., Alvarez, K., Boretto, J., Sarfati, S., Guerreiro, C., et al. (2003). The Y181C substitution in AZT-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase suppresses the ATP-mediated repair of the AZTMP-terminated primer. *J Biol Chem*, in press.
176. Blanca, G., Baldanti, F., Paolucci, S., Skoblov, A. Y., Victorova, L., Hubscher, U., et al. (2003). Nevirapine resistance mutation at codon 181 of the HIV-1 reverse transcriptase confers stavudine resistance by increasing nucleotide substrate discrimination and phosphorolytic activity. *J Biol Chem* 278, 15469-72.
177. Boyer, P. L., Imamichi, T., Sarafianos, S. G., Arnold, E. and Hughes, S. H. (2004). Effects of the Delta67 complex of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on nucleoside analog excision. *J Virol* 78, 9987-97.
178. Palmer, S., Shafer, R. W. and Merigan, T. C. (1999). Highly drug-resistant HIV-1 clinical isolates are cross-resistant to many antiretroviral compounds in current clinical development. *Aids* 13, 661-7.
179. Naeger, L. K., Margot, N. A. and Miller, M. D. (2001). Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. *Antivir Ther* 6, 115-26.
180. Shulman, N., Bosch, R., Wang, J., Albrecht, M., Hellmann, N. S. and Katzenstein, D. A. (2001). *41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago*.
181. Parkin, N., Chappey, C., Petropoulos, C. J. and Hellmann, N. S. (2003). HIV-1 reverse transcriptase mutations that suppress zidovudine resistance also increase in vitro susceptibility to tenofovir, but not stavudine. *Antivir Ther* 8.
182. Picard, V., Angelini, E., Maillard, A., Race, E., Clavel, F., Chene, G., et al. (2001). Comparison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with stavudine and didanosine or zidovudine and lamivudine. *J Infect Dis* 184, 781-4.
183. Back, N. K. and Berkhout, B. (1997). Limiting deoxynucleoside triphosphate concentrations emphasize the processivity defect of lamivudine-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2484-91.
184. Selmi, B., Boretto, J., Navarro, J. M., Sire, J., Longhi, S., Guerreiro, C., et al. (2001). The valine-to-threonine 75 substitution in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its relation with stavudine resistance. *J Biol Chem* 276, 13965-74.
185. Maeda, Y., Venzon, D. J. and Mitsuya, H. (1998). Altered drug sensitivity, fitness, and evolution of human immunodeficiency virus type 1 with pol gene mutations conferring multi-dideoxynucleoside resistance. *J Infect Dis* 177, 1207-13.
186. Kosalaraksa, P., Kavlick, M. F., Maroun, V., Le, R. and Mitsuya, H. (1999). Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an In vitro competitive HIV-1 replication assay. *J Virol* 73, 5356-63.
187. Sarafianos, S. G., Pandey, V. N., Kaushik, N. and Modak, M. J. (1995). Glutamine 151 participates in the substrate dNTP binding function of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 34, 7207-16.
188. Iversen, A. K., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B., et al. (1996). Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol* 70, 1086-90.

189. Garcia-Lerma, J. G., Gerrish, P. J., Wright, A. C., Qari, S. H. and Heneine, W. (2000). Evidence of a role for the Q151L mutation and the viral background in development of multiple dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74, 9339-46.
190. Shafer, R. W., Kozal, M. J., Winters, M. A., Iversen, A. K., Katzenstein, D. A., Ragni, M. V., et al. (1994). Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations. *J Infect Dis* 169, 722-9.
191. Kavlick, M. F., Wyvill, K., Yarchoan, R. and Mitsuya, H. (1998). Emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy. *J Infect Dis* 177, 1506-13.
192. Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., et al. (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2398-402.
193. Shafer, R. W., Winters, M. A., Iversen, A. K. and Merigan, T. C. (1996). Genotypic and phenotypic changes during culture of a multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 strain in the presence and absence of additional reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2887-90.
194. Van Laethem, K., Witvrouw, M., Balzarini, J., Schmit, J. C., Sprecher, S., Hermans, P., et al. (2000). Patient HIV-1 strains carrying the multiple nucleoside resistance mutations are cross-resistant to abacavir. *Aids* 14, 469-71.
195. Ueno, T. and Mitsuya, H. (1997). Comparative enzymatic study of HIV-1 reverse transcriptase resistant to 2',3'-dideoxynucleotide analogs using the single-nucleotide incorporation assay. *Biochemistry* 36, 1092-9.
196. Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M. P., Guerreiro, C., Sarfati, S., et al. (2002). The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using alpha-boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem* 277, 42097-104.
197. Kaushik, N., Harris, D., Rege, N., Modak, M. J., Yadav, P. N. and Pandey, V. N. (1997). Role of glutamine-151 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in RNA-directed DNA synthesis. *Biochemistry* 36, 14430-8.
198. Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martinez, M. A., Domingo, E., et al. (2000). Role of a dipeptide insertion between codons 69 and 70 of HIV-1 reverse transcriptase in the mechanism of AZT resistance. *Embo J* 19, 5752-61.
199. Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. and Hughes, S. H. (2002). Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision. *J Virol* 76, 9143-51.
200. White, K. L., Chen, J. M., Margot, N. A., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Naeger, L. K., et al. (2004). Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 992-1003.
201. van der Hoek, L., Back, N., Jebbink, M. F., de Ronde, A., Bakker, M., Jurriaans, S., et al. (2005). Increased multinucleoside drug resistance and decreased replicative capacity of a human immunodeficiency virus type 1 variant with an 8-amino-Acid insert in the reverse transcriptase. *J Virol* 79, 3536-43.
202. Tamalet, C., Henry, M., Colson, P., Yahi, N., Poggi, C. and Lefeuvre, A. (2004). Uncommon association of T69 3-base-pair insertion plus Q151M multidrug resistance

- mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4493-4.
203. Paolucci, S., Baldanti, F., Tinelli, M., Maga, G. and Gerna, G. (2003). Detection of a new HIV-1 reverse transcriptase mutation (Q145M) conferring resistance to nucleoside and non-nucleoside inhibitors in a patient failing highly active antiretroviral therapy. *Aids* 17, 924-7.
204. Paolucci, S., Baldanti, F., Maga, G., Cancio, R., Zazzi, M., Zavattoni, M., et al. (2004). Gln145Met/Leu changes in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nucleoside and nonnucleoside analogs and impair virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4611-7.
205. De Clercq, E. (2004). New anti-HIV agents in preclinical or clinical development. *Frontiers in Medicinal Chemistry* 1, 543-579.
206. Otto, M. (2004). New nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV infections. *Current Opinion in Pharmacology* 4, 431-436.
207. Kim, H. O., Schinazi, R. F., Nampalli, S., Shanmuganathan, K., Cannon, D. L., Alves, A. J., et al. (1993). 1,3-Dioxolanylpurine nucleosides (2R, 4R) and (2R, 4S) with selective anti-HIV-1 activity in human lymphocytes. *Journal of Medicinal Chemistry* 36, 30-37.
208. Furman, P. A., Jeffrey, J., Kiefer, L. L., Feng, J. Y., Anderson, K. S., Borroto-Esoda, K., et al. (2001). Mechanism of action of 1- β -D-2,6-diaminopurine dioxolane, a prodrug of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitor 1- β -D-dioxolane guanosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 158-165.
209. Jeffrey, J. L., Feng, J. Y., Qi, C. C., Anderson, K. S. and Furman, P. A. (2003). Dioxolane guanosine 5'-triphosphate, an alternative substrate inhibitor of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. Steady state and pre-steady state kinetic analyses. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18971-18979.
210. Mewshaw, J. P., Myrick, F. T., Wakefield, D. A. C. S., Hooper, B. J., Harris, J. L., McCreehy, B., et al. (2002). Dioxolane guanosine, the active form of the prodrug diaminopurine dioxolane, is a potent inhibitor of drug-resistant HIV-1 isolates from patients for whom standard nucleoside therapy fails. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 29, 11-20.
211. Gu, Z., Wainberg, M. A., Nguyen-Ba, N., L'Heureux, L., De Muys, J.-M., Bowlin, T. L., et al. (1999). Mechanism of action and in vitro activity of 1',3'-dioxolanylpurine nucleoside analogues against sensitive and drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2376-2382.
212. Bazmi, H. Z., Hammond, J. L., Cavalcanti, S. C. H., Chu, C. K., Schinazi, R. F. and Mellors, J. W. (2000). In vitro selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (β)-D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1783-1788.
213. Chong, Y., Borroto-Esoda, K., Furman, P. A., Schinazi, R. F. and Chu, C. K. (2002). Molecular mechanism of DAPD/DXG against zidovudine- and lamivudine-drug resistant mutants : a molecular modeling approach. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13, 115-128.
214. Chong, Y., Schinazi, R. and Chu, C. (2003). *12th International HIV Drug Resistance Workshop, Los Cabos, Mexico*.
215. Chong, Y. and Chu, C. (2004). Molecular mechanism of dioxolane nucleosides against 3TC resistant M184V mutant HIV. *Antiviral Research* 63, 7-13.

216. Tremblay, C., Poulin, D., Hicks, J., Selliah, S., Chamberland, A., Giguel, F., et al. (2003). Favorable interactions between enfuvirtide and 1- β -D-2,6-diaminopurine dioxolane in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3644-3646.
217. Painter, G. R., St Claire, R., Feng, J. and Borroto-Esoda, K. (2002). *15th International Conference on Antiviral Research, Prague, Czech Republic*.
218. Gripshover, B., Santana, J., Ribaud, H., Gerber, J., Thomas, C., Hogg, E., et al. (2005). *12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA*.
219. Thompson, M., Richmond, G. and H., K. (2003). *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, Massachusetts, USA*.
220. Stuyver, L., McBrayer, T., Schurmann, D., Kravec, I., Beard, A., Cartee, L., et al. (2004). Potent antiviral effect of reverset in HIV-1-infected adults following a single oral dose. *Antiviral Therapy* 9, 529-536.
221. Murphy, R., Schurmann, D. and Beard, A. (2004). *XVth International AIDS Conference, Bangkok, Thailand*.
222. Schinazi, R., Mellors, J., Bazmi, H., Diamond, S., Garber, S., Gallagher, K., et al. (2002). DPC 817: a cytidine nucleoside analog with activity against zidovudine- and lamivudine-resistant viral variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1394-1401.
223. Ray, A., Schinazi, R., Murakami, E., Basavapathruni, A., Shi, J., Zorca, S., et al. (2003). Probing the mechanistic consequences of 5-fluorine substitution on cytidine nucleotide analogue incorporation by HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 14, 115-125.
224. Ma, L., Hurwitz, S. J., Shi, J., McAtee, J. J., Liotta, D. C., McClure, H. M., et al. (1999). Pharmacokinetics of the antiviral agent -D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine in rhesus monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 381-384.
225. Erickson-Viitanen, S., Wu, J., Shi, G., Unger, S., King, R., Fish, B., et al. (2003). Cellular pharmacology of D-d4FC, a nucleoside analogue active against drug-resistant HIV. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 14, 39-47.
226. Murphy, R., Schurmann, D., Beard, A., Cartee, L., Schinazi, R. and Otto, M. (2004). *11th Conf Retroviruses Opportunistic Infect*.
227. Stoddart, C., Bozeman, C. and Schinazi, R. (2002). *HIV DART 2002, Frontiers in Drug Development for Antiretroviral Therapies, Naples, Florida, USA*.
228. Geleziunas, R., Gallagher, K., Zhang, H., Bacheler, L., Garber, S., Wu, J. T., et al. (2003). HIV-1 resistance profile of the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor beta-D-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine (Reverset). *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 14, 49-59.
229. Murphy, R., Schurmann, D., Levy, R., Beard, A., Wagner, F., Schinazi, R., et al. (2004). *44th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C.*
230. Murphy, R., Schurmann, D., Kravec, I., Beard, A., Eron, J., Cartee, L., et al. (2003). Pharmacokinetics, safety and antiviral activity of the nucleoside Reverset following single doses in HIV-1 infected patients. *Antiviral Therapy* 8, S330.
231. Dutschman, G., Bridges, E., Liu, S., Gullen, E., Guo, X., Kukhanova, M., et al. (1998). Metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L(-)- 5-fluorocytidine and its activity in combination with clinically approved anti-human immunodeficiency virus beta-D(+) nucleoside analogs in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 1799-1804.

232. Dunkle, L. (2001). *Eighth Annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, USA.*
233. Fabrycki, J., Zhao, Y., Wearne, J., Sun, Y., Agarwal, A., Deshpande, M., et al. (2003). *12th International HIV Drug Resistance Workshop, Los Cabos, Mexico.*
234. Dunkle, L. M., Gathe, J., Pedevillano, D., Robison, H., Rice, W. and Pottage, J. J. (2003). *12th International HIV Drug Resistance Workshop, Los Cabos, Mexico.*
235. Chen, S. (2002). Comparative evaluation of L-Fd4C and related nucleoside analogs as promising antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry* 9, 899-912.
236. Schinazi, R. F., MacMillan, A., Cannon, D., Mathis, R., Lloyd, R., Peck, A., et al. (1992). Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of cis-5-fluoro-1-(2(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl)cytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 2423-2431.
237. Black, P., Ussery, M., Otto, M., Stuyver, L., Hurwitz, S., Barnett, T., et al. (2000). *Frontiers in Drug Development for Antiretroviral Therapies, HIV DART, San Juan, Puerto Rico.*
238. Otto, M., Arasteh, K., Kreckel, P., Drauz, D., Beard, A., Cartee, L., et al. (2003). *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA.*
239. Cahn, P. (2003). *2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Paris, France.*
240. De Muys, J., Gourdeau, H., Nguyen-Ba, N., Taylor, D., Ahmed, P., Mansour, T., et al. (1999). Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity, intracellular metabolism, and pharmacokinetic evaluation of 2'-deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1835-1844.
241. Richard, N., Salomon, H., Oliveira, M., Rando, R., Mansour, T., Gu, Z., et al. (2000). Selection of resistance-conferring mutations in HIV-1 by the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (+/-)dOTC and (+/-)dOTFC. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 11, 359-365.
242. Bethell, R., Parkin, N. and Lie, Y. (2003). *12th International HIV Drug Resistance Workshop, Los Cabos, Mexico.*
243. Taylor, D., Ahmed, P., Tyms, A., Wood, L., Kelly, L., Chambers, P., et al. (2000). Drug resistance and drug combination features of the human immunodeficiency virus inhibitor, BCH-10652 [(+/-)-2'-deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine, dOTC]. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 11, 291-301.
244. Collins, P., Shiveley, L., Anderson, C. and Bethell, R. (2004). *11th CROI Conference, San Francisco, USA.*
245. Bethell, R. (2004). *11th CROI Conference, San Francisco, USA.*
246. Locas, C., Damment, S. and Ching, S. (2004). *11th CROI Conference, San Francisco, USA.*
247. Cahn, P., Lange, J., Cassetti, I., Sawyer, J., Zala, C., Rolon, M., et al. (2003). *2nd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Paris, France.*
248. Flexner, C., Van der Horst, C., Jacobson, M., Powderly, W., Duncanson, F. and Ganes, D. (1994). Relationship between plasma concentrations of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials. *Journal of Infectious Diseases* 170, 1394-1403.
249. Rusconi, S. (2003). Alovudine Medivir. *Current Opinion in Investigational drugs* 4, 219-223.
250. Kim, E., Vrang, L., Oberg, B. and Merigan, T. (2001). Anti-HIV type 1 activity of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine for several different multidrugresistant mutants. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 401-407.

251. Calvez, V. (2002). MIV-310 reduces markedly viral load in patients with virological failure despite multiple-drug therapy : results from a 4-week phase II study. *Antiviral Therapy* 7, S3.
252. Katlama, C., Ghosn, J., Tubiana, R., Wirden, M., Valantin, M., Harmenberg, J., et al. (2004). MIV-310 reduces HIV viral load in patients failing multiple antiretroviral therapy: results from a 4-week phase II study. *AIDS* 18, 1299-1304.
253. Sundseth, R., Joyner, S., Moore, J., Dornsife, R. and Dev, I. (1996). The anti-human immunodeficiency virus agent 3'-fluorothymidine induces DNA damage and apoptosis in human lymphoblastoid cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 331-335.
254. Chu, C., Yadav, V., Chong, Y. and Schinazi, R. (2005). Anti-HIV activity of (-)-(2R,4R)-1(2-Hydroxymethyl-1,3-dioxolan-4-yl)thymine against drug-resistant HIV-1 mutants and studies of its molecular mechanism. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 3949-3952.
255. Chu, C., Yadav, V., Rapp, K., Chong, Y. and Schinazi, R. (2005). *12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA.*
256. Kim, H. O., Ahn, S. K., Alves, A. J., Beach, J. W., Jeong, L. S., Choi, B. G., et al. (1992). Asymmetric synthesis of 1,3-dioxolane pyrimidine nucleosides and their anti-HIV activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 35, 1987-1995.
257. Chu, C., Chong, Y. and RF., S. (2004). *13th International HIV Drug Resistance Workshop, Canary Islands, Spain.*
258. Website., M., www.medivir.se/OuterFrameEng.asp. and Pressreleases 2002, --. (2002). *ICAAC, 42nd Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy meeting, San Diego, California.*
259. Zhang, H., Öberg, B., Harmenberg, J., Vrang, L., Zhou, X., Rydberg, C., et al. (2002). *42nd Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, California, USA.*
260. Loeb, L., Essigmann, J., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. and Mullins, J. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1492-1497.
261. Harris, K., Brabant, W., Styrchak, S., Gall, A. and Daifuku, R. (2005). KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. *Antiviral Research* 67, 1-9.
262. Anderson, J. P., Daifuku, R. and Loeb, L. A. (2004). Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annual Review of Microbiology* 58, 183-205.
263. Murakami, E., Basavapathruni, A., Bradley, W. and Anderson, C. (2005). Mechanism of action of a novel viral mutagenic covert nucleotide : molecular interactions with HIV-1 reverse transcriptase and host cell DNA polymerases. *Antiviral Research* 67, 10-17.
264. Maag, H., Rydzewski, R., McRoberts, M., Crawford-Ruth, D., Verheyden, J. and Prisbe, E. (1992). Synthesis and anti-HIV activity of 4-azido- and 4-methoxynucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry* 35, 1440-1451.
265. Sugimoto, I., Shuto, S., Mori, S., Shigeta, S. and Matsuda, A. (1999). Synthesis of 4' alpha-branched thymidines as a new type of antiviral agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 385-388.
266. Kodama, E., Kohgo, S., Kitano, K., Machida, H., Gatanaga, H., Shigeta, S., et al. (2001). 4-Ethynyl nucleoside analogs: potent inhibitors of multidrug resistant human immunodeficiency virus variants In vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1539-1546.

267. Chen, M. S., Suttman, R., Papp, E., Cannon, P., McRoberts, M., Bach, C., et al. (1993). Selective action of 4-azidothymidine triphosphate on reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 and human DNA polymerases alpha and beta. *Biochemistry* 32, 6002-6010.
268. De Clercq, E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology* 30, 115-133.
269. Tuske, S., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Naeger, L. K., White, K. L., et al. (2004). Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol* 11, 469-74.
270. Boyer, P. L., Julias, J. G., Marquez, V. E. and Hughes, S. H. (2005). Fixed conformation nucleoside analogs effectively inhibit excision-proficient HIV-1 reverse transcriptases. *J Mol Biol* 345, 441-50.
271. Biebricher, C. and Eigen, M. (2005). The error threshold. *Virus Research* 107, 117-127.
272. Smith, R. A., Loeb, L. A. and Preston, B. D. (2005). Lethal mutagenesis of HIV. *Virus Research* 107, 215-228.
273. Daifuku, R. (2003). Stealth nucleosides : mode of action and potential use in the treatment of viral diseases. *BioDrugs* 17, 169-177.
274. Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., et al. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* 6, 1375-1379.
275. Crotty, S., Cameron, C. E. and Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe : direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6895-6900.
276. Contreras, A., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. and Chung, R. (2002). Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *Journal of Virology* 76, 8505-8517.

Legend to figures

Figure 1: Nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) approved by the Food and Drug Administration.

Figure 2: The main NRTI resistance mutations. (A) Localisation of the main NRTI resistance mutation. The palm and fingers sub-domains of HIV-1 RT are in red and blue, respectively. The resistance mutations are marked: green for resistance to ddI, ddC and 3TC, dark blue for resistance to AZT and pink for cross-resistance to AZT and ddI or ddC. The primer/template backbone is in yellow/gray, with only the base-pair near the active site shown in balls and sticks; the incoming dTTP and the Mg^{2+} ions are in orange. (B) NRTIs, their associated resistance mutations and their contribution to resistance.

Figure 3 : Schematic representation of the polymerisation and excision reactions carried out by HIV-1 RT. N and P correspond to the N (nucleotide) and P (priming) sites of RT (see text). (A) Incorporation of a natural cognate dNTP. The end of the primer is in the P site and the incoming dNTP binds to the N site. Its γ -phosphate is then joined to the growing DNA chain and PPi is released. Translocation moves the end of the primer into the P site and a new dNTP can bind to the end site for the cycle to continue. The efficiency of incorporation of a dNTP or any dNTP analogue depends on its affinity for the primer/template-RT complex (K_d) and on the incorporation rate (k_{pol}). (B) Model for the excision reaction. When AZTMP is incorporated into the DNA, the next incoming dNTP cannot bind due to steric crowding of the azido group. The AZTMP-blocked primer resides primarily in the N site and the pyrophosphate donor (PPi or ATP) can bind, AZTMP is removed and forms a dinucleotide tetraphosphate, AZTppppA. (C) Dead-End Complex (DEC) formation. When a chain terminator other than AZTMP is incorporated, translocation of the end of the primer to the P site occurs and the next cognate nucleotide binds to the N site. Because of the lack of a 3' OH group at the end of the primer, the complex is stalled, forming a so-called DEC.

Figure 4: Nucleoside RT inhibitors in clinical development.

Figure 5: Inhibition of reverse transcription by “delayed polymerisation arrest”. The triphosphate dNTP analogue (in black) is incorporated into the growing DNA chain. Due to its

non-modified 3'OH group on the ribose moiety, it allows incorporation of the next complementary nucleotides and induces a delayed polymerisation arrest, most likely due to structural alterations of the primer/template duplex.

Figure 6 : Structure of mutagenic nucleosides in clinical trials.

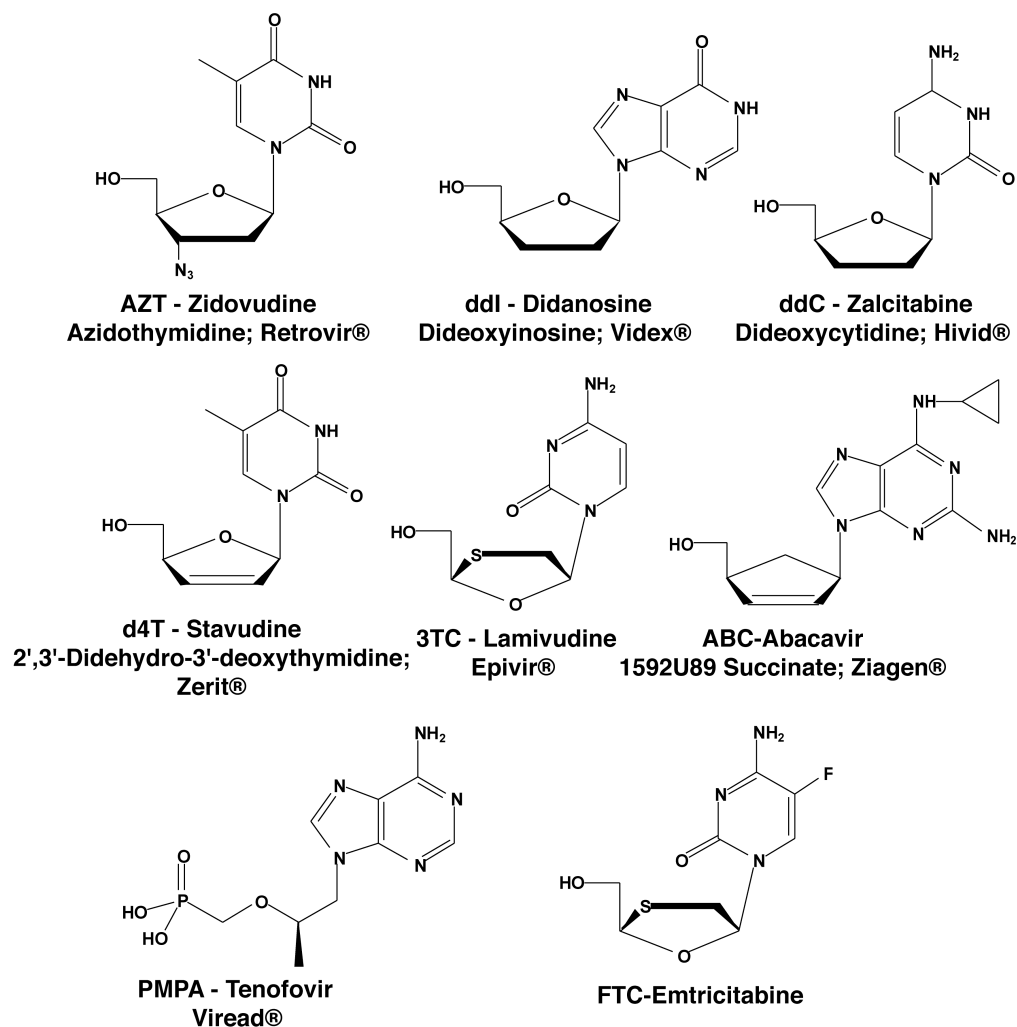


Figure 1

Table 1: Recommended and contraindicated drug associations for an initial antiretroviral treatment (adapted from [65])

Recommended associations			
2 NRTIs		+	1 NNRTI or 1 IP (+ ritonavir)
AZT ⁽¹⁾ or TDF or ddI or ABC ⁽²⁾		+ 3TC ⁽¹⁾ or FTC	Efavirenz or Nevirapine ⁽²⁾ Fosamprenavir or Indinavir or Lopinavir or Saquinavir
Conceivable choices			
Associations		Observations	
d4T + 3TC + [1 NNRTI ou 1 IP] AZT + ddI + [1 NNRTI ou 1 IP]		<i>No advantages, more constraints and less well tolerated</i>	
AZT + 3TC + ABC		<i>Risks of a poorer virologic response and hypersensitisation to ABC</i>	
2 NRTIs + nelfinavir		<i>Necessity of a very good observance and administration with a meal</i>	
Contraindicated associations or treatments			
Monotherapy Bitherapy of NRTIs Tritherapy of NRTIs□ ABC + TDF + 3TC TDF + ddI + 3TC d4T + ddI + 3TC d4T + ddI + ABC		<i>Insufficient efficacy with compounds available</i> <i>Rapid selection of resistant viruses</i>	
d4T + ddI d4T + ddC ddI + ddC		<i>Unfavorable advantages/risks ratio</i> <i>Risks of high toxicity</i>	
Treatment including AZT + d4T		<i>Antagonistic effect</i>	
Treatment including 3TC + FTC		<i>No advantages expected, molecules with the same pattern of resistance</i>	
Efavirenz in pregnant women		<i>Teratogenicity</i>	
Efavirenz + nevirapine		<i>No benefits, synergistic toxicity</i>	
Ritonavir at full dose, as the only PI ⁽³⁾		<i>Bad tolerance</i>	

⁽¹⁾ AZT and 3TC association is the most studied combination of 2 NRTIs

⁽²⁾ ABC and nevirapine association is contraindicated

⁽³⁾ Ritonavir is commonly administrated with others PIs to increase their potency

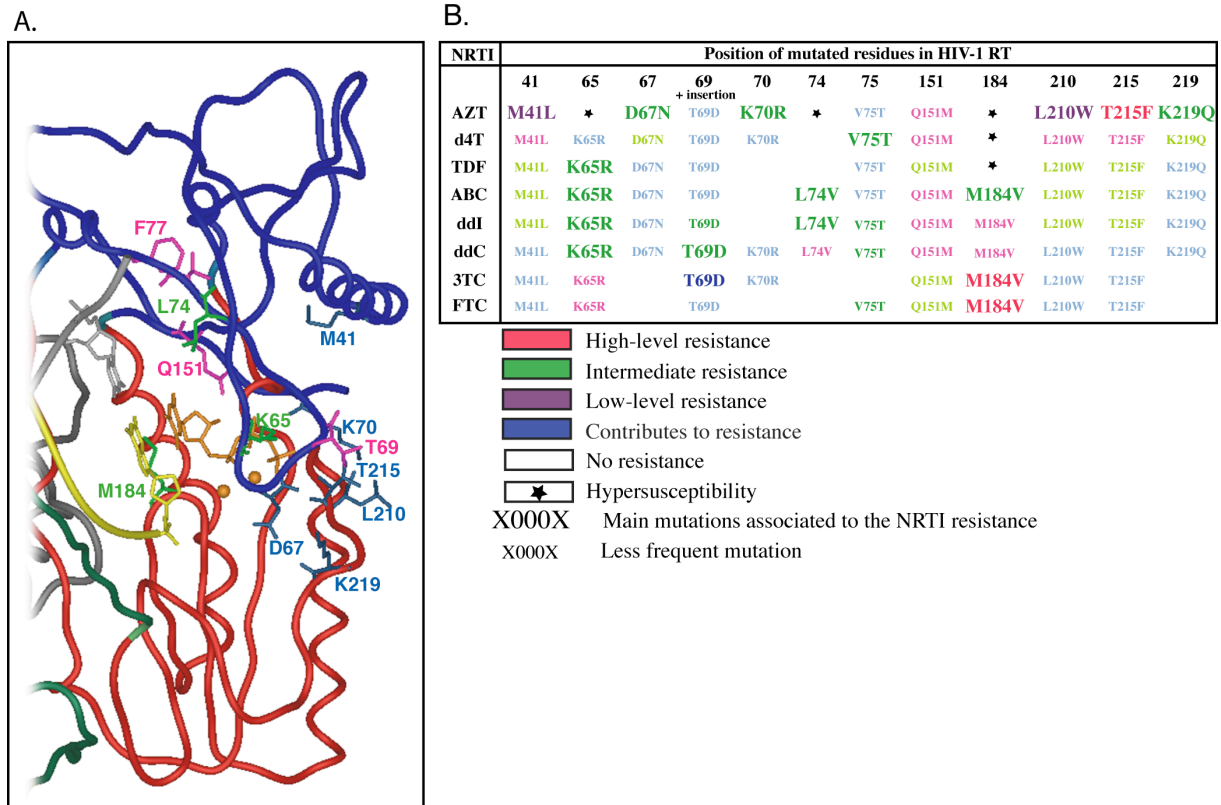


Figure 2

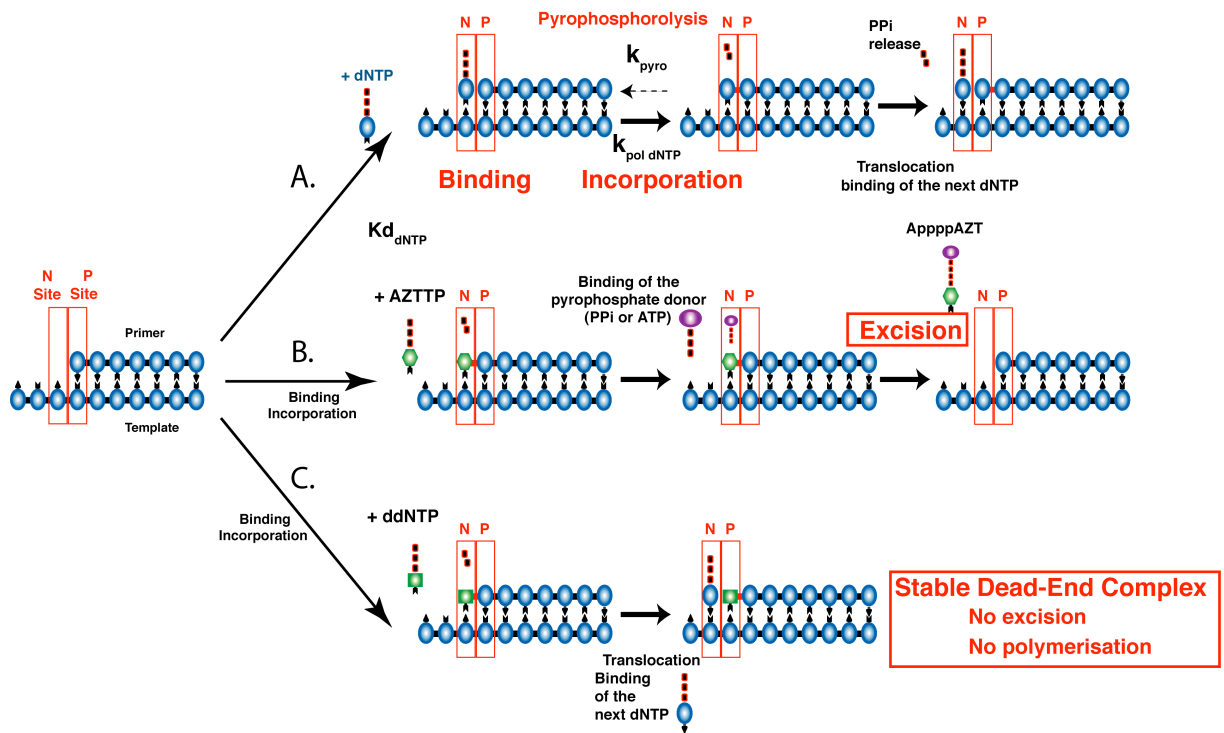


Figure 3

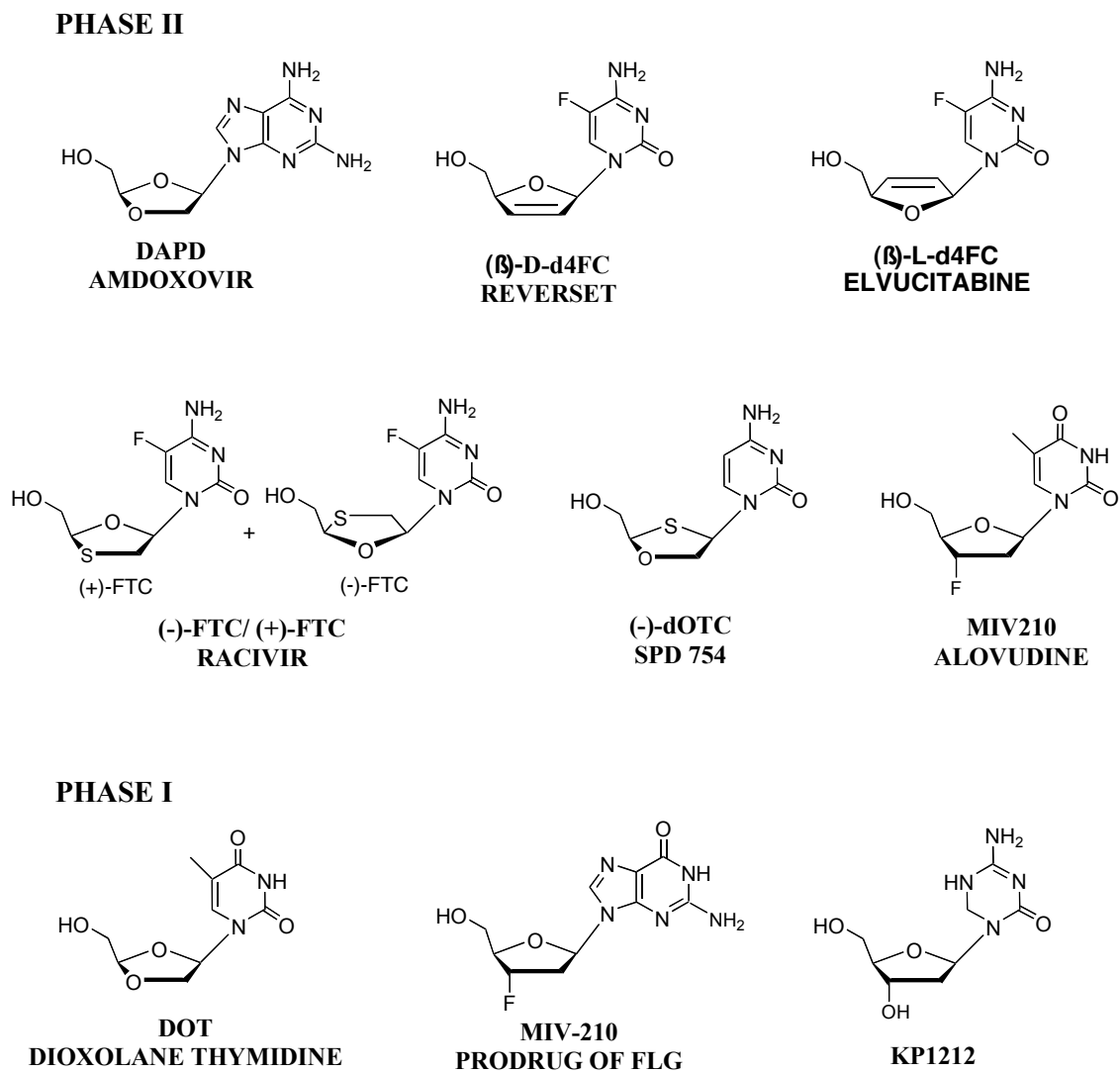


Figure 4

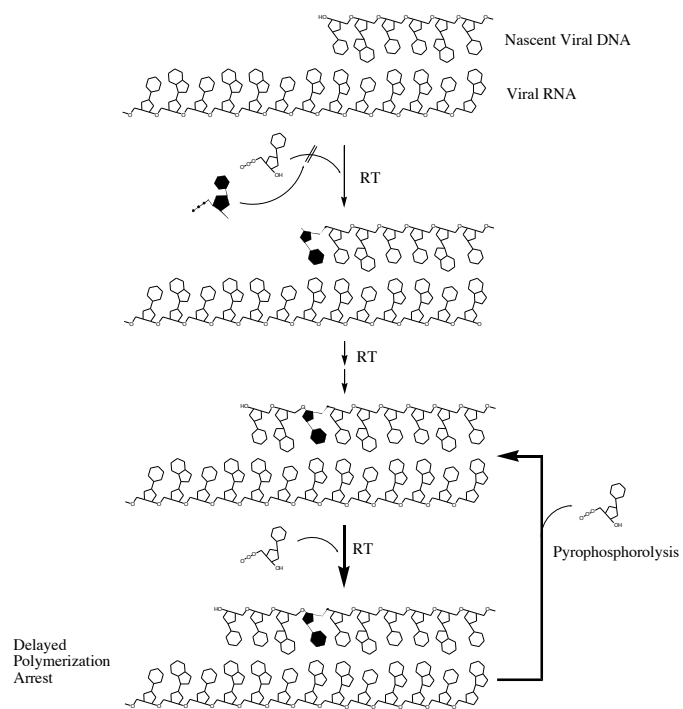


Figure 5

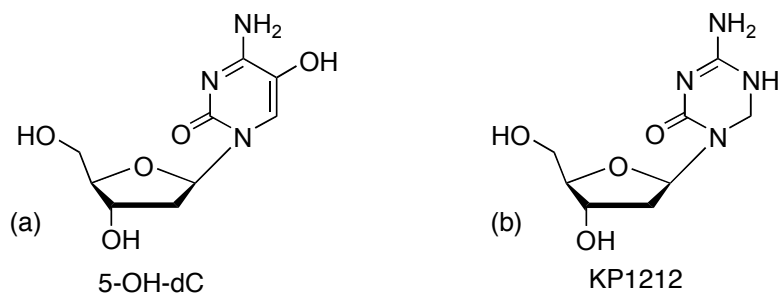


Figure 6

2. Les inhibiteurs non analogues de nucléosides (NNRTIs)

Actuellement, seuls trois inhibiteurs de type NNRTIs sont approuvés par la FDA ; la névirapine, la délavirdine et l'efavirenz (Figure 34). Il s'agit d'inhibiteurs allostériques non compétitifs (309) qui ne modifient pas l'affinité de la RT pour les dNTPs et pour les acides nucléiques. La fixation d'un NNRTI, hors du site catalytique polymérase, induit un changement conformationnel de la RT conduisant au déplacement des résidus aspartates catalytiques (103, 309) (Figure 21). Ce type d'inhibiteur bloque l'étape chimique de la polymérisation (281).

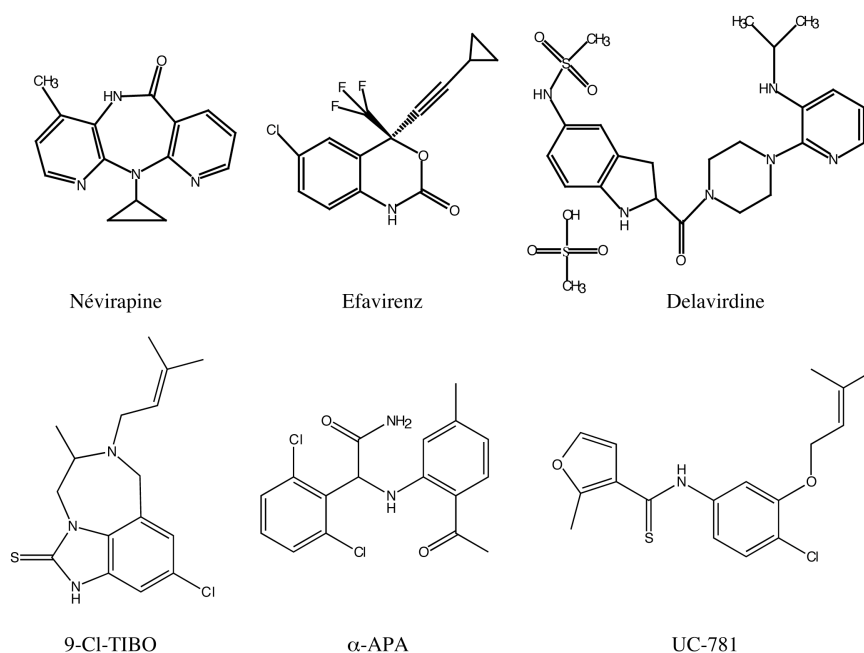


Figure 34 : Inhibiteurs non-nucléosidiques de la rétrotranscriptase du VIH-1.

La névirapine, l'efavirenz et la délavirdine sont approuvés par la FDA pour une utilisation clinique, le TIBO et l'α-APA sont des molécules de première génération et l'UC-781 est utilisé dans des préparations de microbicides.

La poche de fixation des NNRTIs (Figure 35) est localisée dans le sous-domaine paume de p66, à proximité du site catalytique polymérase, du «primer grip» et de la base du sous-domaine pouce. Elle contient les chaînes latérales des résidus aromatiques Y181, Y188, F227, W229 et hydrophobes P95, L100, V106, V108, V179, L234 et P236 de la sous-unité p66 (Figure 36.A).

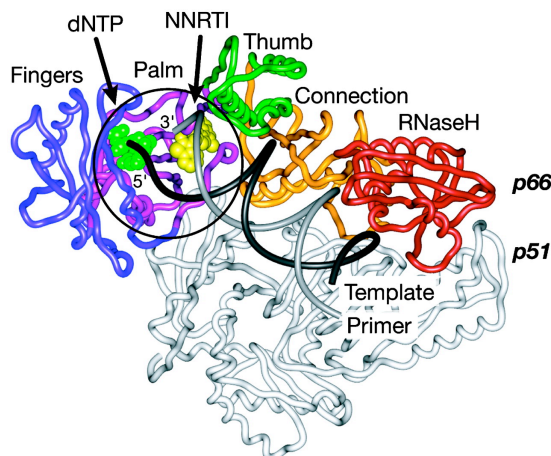


Figure 35 : *Modèle de la RT du VIH-1 complexée à un NNRTI, un complexe matrice/amorce et à un nucléotide entrant.*

Le NNRTI CP-94,707 (jaune) est représenté dans un complexe ternaire de la RT du VIH-1 lié aux substrats, ADN (amorce en gris clair et matrice en gris foncé) et dNTP entrant (vert clair). Les domaines doigts (bleus), paume (pourpre), pouce (vert), connection (orange) et RNase H (rouge) de p66 sont colorés tandis que la sous-unité p51 est représentée en blanc. La région encerclée inclut le site actif polymérase et la poche de liaison des NNRTIs. (D'après (258)).

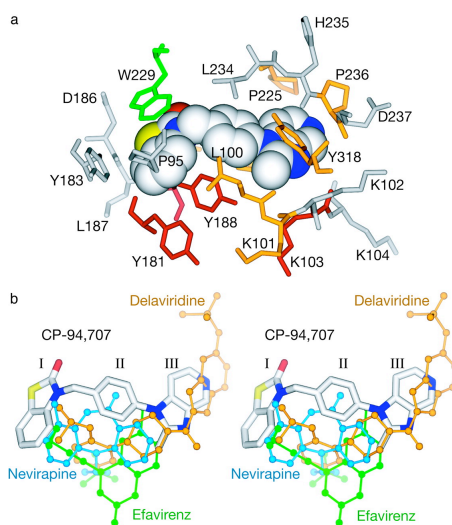


Figure 36 : *Résidus de la RT du VIH-1 impliqués dans la liaison des NNRTIs.*

(A) Site de fixation des NNRTIs contenant l'inhibiteur CP-94,707. La mutation des résidus en rouge (Y181, Y188 et/ou K103) confère une importante résistance à la névirapine, à l'efavirenz et/ou à la délavirdine. Le CP-94,707 est actif contre le double mutant Y181I/Y188L et le simple mutant K103N. Les autres résidus impliqués dans des résistances communes aux NNRTIs sont représentés en jaune (L100, K101, P225, P236, Y318 et V106 et V108, cachés derrière le CP-94,707). La mutation du résidu W229 (vert) diminue l'activité polymérase de la RT mais ne donne pas naissance à une résistance aux NNRTIs. (B) Vue stéréo montrant la position du CP-94,707 (blanc) par rapport à la névirapine (bleu), à la délavirdine (orange) et à l'efavirenz (vert). (D'après (258)).

La comparaison des structures cristallographiques de la RT du VIH-1, en absence ou en présence la névirapine, a révélé que cette cavité ne préexiste pas dans la forme libre de la RT (189, 275, 285). La fixation de l'inhibiteur est responsable de sa formation et implique entre autres des changements conformationnels des résidus clés Y181 et Y188 (151, 285).

Le site de fixation des NNRTIs n'est pas figé et les divers inhibiteurs établissent des interactions variables avec les résidus de la poche en fonction de leur taille, forme, composition chimique et mode de fixation (71) (Figure 36.B). Il se produit néanmoins de très nombreuses interactions van der Waals et π - π entre les cycles aromatiques des NNRTI et des acides aminés de la poche de fixation. Certains NNRTIs établissent également une liaison hydrogène avec la chaîne principale du résidu K101.

Malgré la diversité chimique des molécules de première génération, la névirapine, le TIBO et β -APA (Figure 34) lient le site de fixation en adoptant une forme identique, «*en papillon*» (90) (Figure 36.B). En 2004, Pata et coll. ont montré qu'un nouvel NNRTI, le CP-94,707, adopte une conformation légèrement différente de celle des NNRTIs connus (Figure 36.A et .B). Il est actif contre la majorité des RT résistantes aux autres NNRTIs (258) car les substitutions des résidus Y181 et Y188 n'influent que très peu sur sa fixation à la RT. En outre, de nombreux NNRTIs plus récents lient la RT selon un mode plus flexible, en forme de «*cheval*». C'est le cas de dérivés du bis(hétéroaryl)pipérazine (BHAP) (104), du HBY097 (149), de molécules dérivées de phénylethylthiazolylthiourée (PETT) (143), de l'étravirine et d'analogues de diarylpyrimidine (DAPY) (70). Les analogues de DAPY fixent le site NNRTI selon deux conformations distinctes qui autorisent une flexibilité (wiggling) et une capacité de réorientation-réadaptation (jiggling) de l'inhibiteur. La variabilité conformationnelle des DAPYs semble être essentielle à leur efficacité à l'encontre des RT résistantes.

La sélection rapide de virus résistants aux NNRTIs est inévitable et un grand nombre de mutations de résistance ont été décrites. Elles sont situées dans le site de fixation du NNRTI ou au niveau de résidus qui interagissent directement avec l'inhibiteur (Figure 36.A). À titre d'exemple, les premières mutations associées à une forte résistance à la névirapine sont les mutations Y181C et Y188L, qui induisent une baisse de la liaison des NNRTIs en diminuant les interactions aromatiques avec l'inhibiteur (275). Ces mutations affectent directement les interactions inhibiteur-protéine mais également la taille, la forme et l'environnement chimique de la poche de liaison.

D'autre part, le mutant K103N semble affecter les cinétiques de liaison des inhibiteurs en stabilisant l'état non lié de la RT (150), état dans lequel la cavité de fixation des NNRTIs n'existe pas. En conclusion, les mutations de résistance des NNRTIs ont soit un effet direct en modifiant la taille, la forme et la polarité de la poche de fixation, soit un effet indirect en modifiant l'accès à la poche.

Les NNRTIs inhibent spécifiquement la RT du VIH-1 (74) et bien que la RT du VIH-2 présente une poche hydrophobe très semblable à celle du VIH-1, en raison de leur forte homologie de séquence, elle contient les substitutions K101A, Y181I et Y188L conférant une résistance aux NNRTIs dans le cas du VIH-1 (274).

3. Les inhibiteurs de protéase (Figure 37)

Les inhibiteurs de la protéase virale (PR) empêchent le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol en protéines structurales et enzymatiques. La première génération d'inhibiteurs de protéase (IPs) partage les mêmes déterminants structuraux une liaison hydroxyéthylène non-clivable mimant les liaisons peptidiques reconnues et clivées par la protéase virale (239). Six inhibiteurs appartiennent à cette classe et sont approuvés par la FDA le ritonavir, le saquinavir, le nelfinavir, l'indinavir, l'amprenavir et le lopinavir. L'association d'un inhibiteur du métabolisme du cytochrome P450 aux PIs permet d'augmenter leur biodisponibilité systémique, en réduisant l'effet de premier passage et de clairance rénale. Ce principe est utilisé avec le lopinavir dans la préparation commerciale Kaletra®.

Cependant, l'augmentation de résistances croisées entre ces inhibiteurs nécessite l'obtention de molécules non peptidomimétiques et/ou présentant un large spectre d'action contre les protéases résistantes. Un sulfonamide, le tipranavir (267), ainsi que l'atazanavir (63), un analogue d'aza-dipeptide, sont des composés répondant à ces critères. L'atazanavir a récemment été approuvé par la FDA pour une utilisation clinique tandis que le tipranavir est toujours en cours de développement.

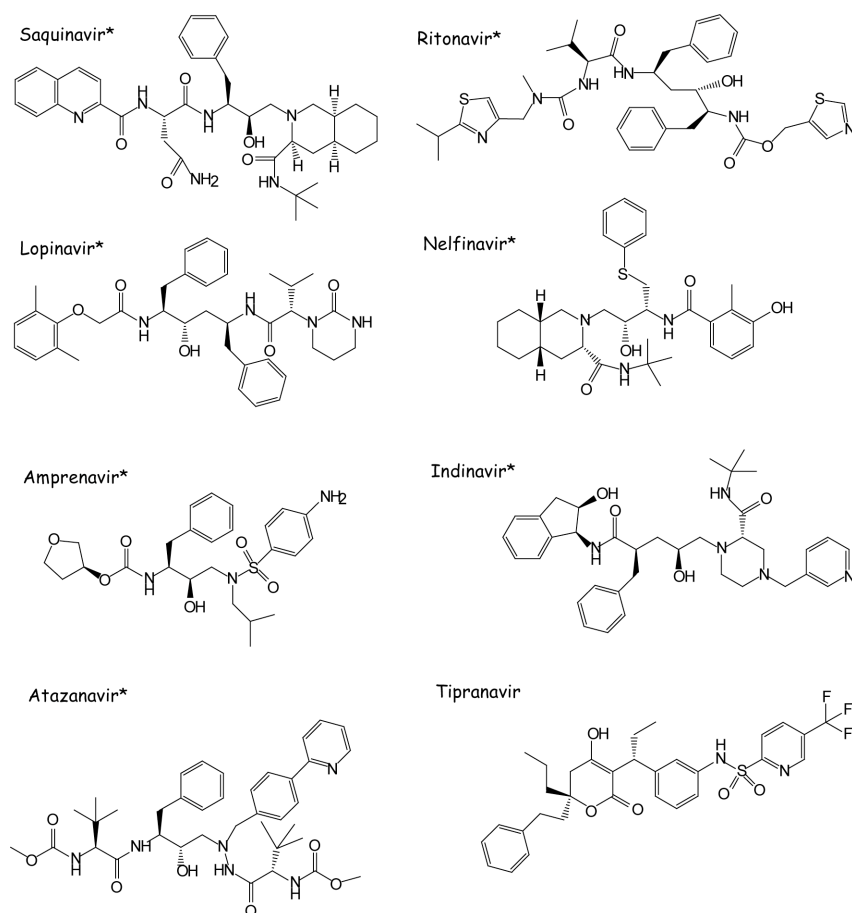
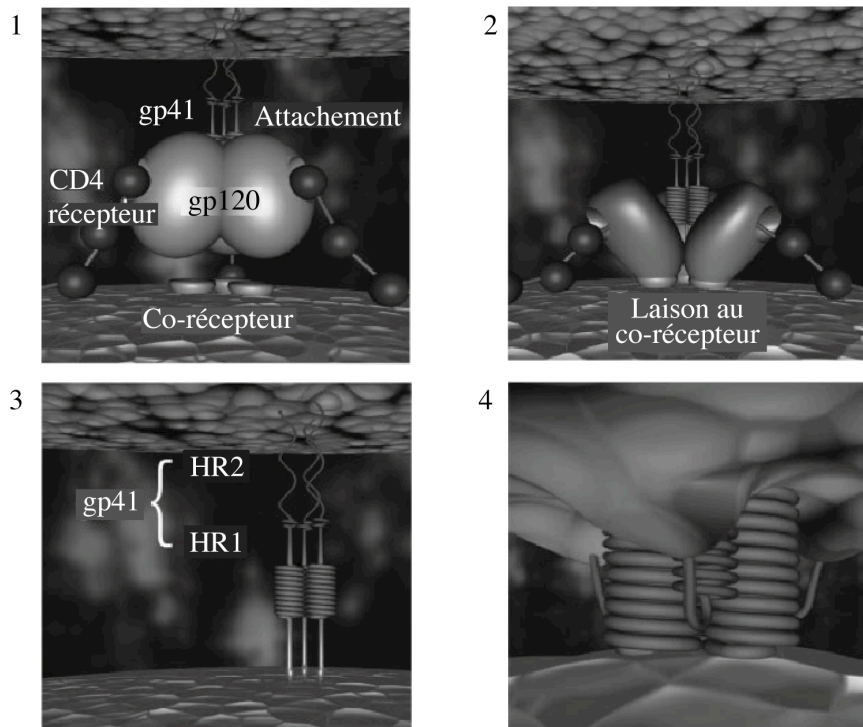


Figure 37 : Les inhibiteurs de la protéase virale du VIH (*composés approuvés par la FDA).

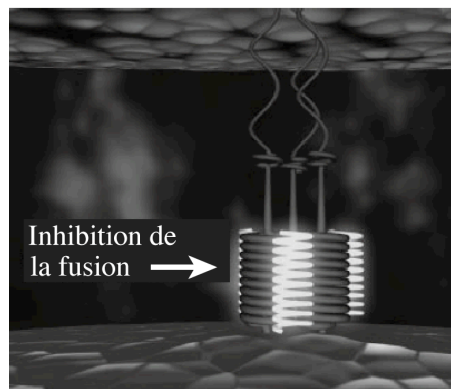
4. Les inhibiteurs de fusion, le T-20 (129)

Lors de l'infection (Figure 38), l'interaction entre le co-récepteur CXCR4 ou CCR5 et gp120 est suivie de l'ancrage du peptide de fusion de gp41 (cf. figure 16.B) dans la membrane cellulaire. La dissociation de gp41 et gp120 permet l'exposition de la région HR1 de gp41 (région Hydrophobe C-terminale, HC, figure 16.B) autorisant la formation d'une structure trimérique en «*coiled-coil*». Dans un second temps, les régions HR2 de gp41 (région Hydrophobe N-terminale, HN, figure 16.B) se restructurent et s'associent aux sillons hydrophobes du trimère de HR1, en formant une structure stable de six hélices. Cette étape rapproche les membranes virale et cellulaire et permet la fusion des bicouches phospholipidiques. Au début du processus, la zone hydrophobe HR1 de gp41 devient accessible pour la liaison d'inhibiteurs qui empêchent l'interaction HR1/HR2 et ainsi la formation du complexe d'hélices.

A. Mécanisme de fusion



B. Inhibition de la fusion par le T-20



C. Séquence en acides aminés du T-20

Nt-YTSLIHSLLIEESQNQQEKN-
EQELLELDKWASLWNWF-Ct

Figure 38 : Mécanisme de reconnaissance/fusion des membranes virale et cellulaire et inhibition de la fusion par le T-20 (D'après (129)).

A. Mécanisme de fusion des membranes virale (supérieure) et cellulaire (inférieure). 1. Reconnaissance gp120/CD4 induisant un changement conformationnel de gp120. 2. Reconnaissance du co-récepteur cellulaire par gp120. 3. Insertion du peptide de fusion de gp41 dans la bicouche cellulaire et exposition des régions HR1 (Hydrophobic Région 1 ou HC) et HR2 (Hydrophobic Région 2 ou HN). 4. Association HR1/HR2 et formation d'une structure stable de 6 hélices rapprochant les membranes en vue de leur fusion. **B.** Fixation du T-20, peptide de 36 acides aminés correspondant aux résidus 127 à 162 de la région HR2 de gp41. **C.** Séquence du T-20.

Le T-20 (Pentafuside, Enfuvirtide, Fuzeon) (338) (Figure 38.C), un peptide de 36 acides aminés correspondant aux résidus 127 à 162 de la région HR2 de gp41 est le seul inhibiteur non-NRTI, non-NNRTI et non-PI à avoir été approuvé par la FDA, courant mars 2003. Il se lie de façon compétitive aux sillons hydrophobes du trimère de HR1 et est spécifique du VIH-1.

Un autre composé non-peptidique, le RPR 103611 (230), un dérivé de l'acide bétulinique est également un composé bloquant l'infection par une interaction avec gp41, mais son mode d'action reste à élucider.

B. La mise en place d'un traitement antiviral (78)

En l'absence de moyen d'éradiquer le VIH-1, l'objectif des traitements antiviraux est de diminuer la mortalité et la morbidité induite par l'infection, à l'aide d'une prévention et/ou d'une restauration du déficit immunitaire. En outre, la prise en charge de patients adultes infectés par le VIH-1 est complexe, car elle nécessite une individualisation des traitements, qui présentent eux-mêmes une morbidité propre. L'utilisation à long terme des molécules antivirales disponibles induit fréquemment des effets indésirables diminuant la qualité de vie des patients. À titre d'exemple, l'abacavir est à l'origine, dans environ 5% des cas, d'un syndrome d'hypersensibilisation pouvant être mortel, tandis que la stavudine, la névirapine, l'amprénavir peuvent induire respectivement des lipodystrophies, des hépatites ou des réactions cutanées sévères ainsi que des coliques néphrétiques. Néanmoins, le rapport bénéfices/risques reste très favorable.

La nécessité de mettre en place un traitement antiviral chez un patient est dictée par le nombre de ses lymphocytes T CD4, principale cible du VIH-1 mais également chef d'orchestre du système de défense immunitaire (78):

- Si le nombre de lymphocytes T CD4 est supérieur à $350/\text{mm}^3$, le traitement antirétroviral n'est pas recommandé, car le bénéfice thérapeutique attendu n'est pas suffisant au regard des risques inhérents à la poursuite à long terme d'un tel traitement.
- Si le nombre de lymphocytes T CD4 est compris entre $200/\text{mm}^3$ et $350/\text{mm}^3$, le traitement doit être entrepris et son initiation est choisie en fonction de trois critères: l'état de préparation du patient, la vitesse de décroissance des lymphocytes T CD4 et la valeur de la charge virale plasmatique.

- Si le nombre de lymphocytes T CD4 est inférieur à $200/\text{mm}^3$, le choix est plus complexe. Il s'agit de patients détectés tardivement dont l'infection par le VIH-1 est à un stade avancé. Il est parfois nécessaire de traiter en premier lieu une infection opportuniste, puis d'initier ensuite un traitement anti-VIH. Inversement, un traitement anti-VIH sera immédiatement prescrit dans le cas de maladies opportunistes pour lesquelles il n'existe pas de traitement spécifique (cryptosporidiose, encéphalite à VIH...). La restauration immunitaire induite doit ensuite contrôler l'infection opportuniste.

Enfin, d'autres éléments sont pris en compte, comme l'existence de problèmes de santé non liés à l'infection du VIH-1 (risques cardiovasculaires, présence d'une co-infection au VHC ou VHB...), une grossesse, une perspective de procréation ou encore l'état psychologique du patient. En effet, l'adhésion du patient et son observance au traitement constituent un facteur essentiel du succès thérapeutique (40). Dans le cas de mauvaises prises d'inhibiteur, la réplication virale se produit à un faible taux, mais elle engendre et sélectionne des mutations de résistance dans les gènes codant pour la RT et/ou la PR. Ces mutations permettent au virus mutant de mieux se répliquer et de devenir prédominant dans la population virale. Le virus échappe ainsi au traitement utilisé.

L'objectif du premier traitement anti-VIH est de rendre la charge virale indétectable, au seuil le plus bas et le plus rapidement possible. Une multithérapie associant 2 NRTIs avec un NNRTI ou un IP est généralement utilisée afin d'obtenir un traitement initial suffisamment puissant. Le tableau 2 récapitule les associations d'inhibiteurs recommandées, envisageables et déconseillées lors d'un premier traitement antirétroviral. Il est à noter que toutes les combinaisons ne sont pas possibles, car certaines d'entre elles ont une efficacité insuffisante, dont de nombreuses associations de 3 NRTIs (107, 120, 167), induisent un risque de toxicité grave (association d4T + ddI (78)), sont antagonistes (association AZT + d4T (78)) ou présentent une synergie de toxicité (éfavirenz + névirapine (328)).

Plusieurs études ont montré que l'efficacité de l'association de 2 NRTIs avec 1 NNRTI est semblable à celle de 2 NRTIs avec un IP. Cependant une mauvaise observance lors d'un traitement avec un NNRTI présente un risque élevé de sélectionner des quasi-espèces virales résistant à l'ensemble des NNRTIs, tandis qu'un IP entraîne rarement des résistances précoces à l'ensemble des inhibiteurs de protéase (78). L'administration des IPs est potentialisée avec du ritonavir, un autre IP, qui permet de réduire la posologie ou la fréquence des prises.

Introduction

En effet, le ritonavir inhibe le cytochrome P450, ce qui provoque une augmentation de la concentration plasmatiques des autres IPs co-administrés (183). En revanche, une seule trithérapie (Trizivir®) reposant sur l'association de 3 NRTIs (AZT, 3TC et ABC) est envisageable (131, 312). Elle présente l'avantage d'être très simple d'utilisation (1 comprimé 2 fois par jour) mais peut induire un syndrome d'hypersensibilité lié à l'ABC. Enfin, l'administration du peptide T-20, non disponible par voie orale, est utilisée en dernier recours.

Associations d'inhibiteurs recommandées		
2 NRTIs	+	1 NNRTI ou 1 IP (+ ritonavir)
AZT ⁽¹⁾ ou TDF ou + ddi ou ABC ⁽²⁾	3TC ⁽¹⁾ ou FTC	Fosamprénavir ou Indinavir ou Lopinavir ou Saquinavir
Autres choix envisageables		
Combinaisons	Remarques	
d4T + 3TC + [1 NNRTI ou 1 IP] AZT + ddi + [1 NNRTI ou 1 IP] AZT + 3TC + ABC (Trizivir) 2 NRTIs + nelfinavir	<p style="text-align: center;"><i>N'offrent pas d'avantages, sont plus contraignantes et sont moins bien tolérées</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Risques de moins bonne réponse virologique et d'hypersensibilisation à l'abacavir</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Impose une prise impérative avec un repas et une très bonne observance</i></p>	
Associations d'antirétroviraux déconseillées		
Monothérapie Bithérapie de NRTIs Trithérapies de NRTIs : ABC + TDF + 3TC TDF + ddi + 3TC d4T + ddi + 3TC d4T + ddi + ABC	<p style="text-align: center;"><i>Efficacité insuffisante avec les agents actuellement disponibles</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Sélection rapide de virus résistants</i></p>	
d4T + ddi d4T + ddC ddi + ddC	<p style="text-align: center;"><i>Rapport bénéfice/risque défavorable</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Risque de toxicité grave</i></p>	
Schéma incluant AZT + d4T	<p style="text-align: center;"><i>Antagonisme</i></p>	
Schéma incluant 3TC + FTC	<p style="text-align: center;"><i>Pas de bénéfice attendu, molécules ayant le même profil de résistance</i></p>	
Efavirenz chez la femme enceinte	<p style="text-align: center;"><i>Tératogénicité chez l'animal</i></p>	
Efavirenz + névirapine	<p style="text-align: center;"><i>Pas de gain d'efficacité, Synergie de toxicité</i></p>	
Ritonavir à dose pleine comme seul IP	<p style="text-align: center;"><i>Mauvaise tolérance</i></p>	

(1) La combinaison zidovudine + lamivudine est la combinaison de 2 NRTIs la plus étudiée

(2) L'association abacavir + névirapine est déconseillée

Tableau 2 Les associations d'inhibiteurs en thérapies (d'après (78))

C. Stratégies en cours de développement

1. Les inhibiteurs de l'intégrase virale ((170), figure 39)

L'intégrase est l'une des trois enzymes clés du cycle rétroviral et la mise au point d'inhibiteurs de cette enzyme pourrait éviter l'infection chronique au VIH-1, liée à l'intégration de l'ADN proviral. De plus, en raison de l'absence d'enzyme homologue humaine connue, il serait plus aisé d'obtenir des molécules anti-intégrase de faible toxicité et de haute sélectivité. Bien que de nombreux composés aient montré, *in vitro*, une inhibition de l'intégrase, seuls le S-1360 (Shionogi & Co. Ltd) et le L-870,810 (Merck Research Laboratories), deux dérivés des dikéto-acides (Figure 39) sont allés jusqu'en phases d'essais cliniques. Le S-1360 est en phase clinique I/II et dérive du 5-CITEP, son IC_{50} sur le transfert de brin est de $0,02 \mu M$. Récemment, le S-1360 et trois de ses analogues ont servi à une recherche 3D de molécules présentant des caractéristiques structurales communes. Sur 1700 composés, 110 ont été sélectionnés pour une étude biologique. Les composés contenant à la fois un groupe acide salicylique et un groupe rhodamine se sont révélés être de puissants inhibiteurs de l'intégrase, démontrant l'efficacité de l'union entre une approche bioinformatique et biologique (73).

Le L-870,810 (139), une naphtyridine carboxamide, inhibe spécifiquement le transfert de brin de l'intégrase du VIH-1, *in vitro*. Il est en phase clinique I ($IC_{50} = 10nM$) et il possède la particularité de ne pas présenter de résistance croisée avec les autres dikéto-acides. L'activité antirétrovirale d'un analogue, le L-870,812, a été testée sur des macaques rhésus infectés par la souche SHIV-89.6P, et fournit les preuves de l'efficacité *in vivo* d'inhibiteur d'intégrase lors d'infections rétrovirales (140).

Aujourd'hui, le mécanisme d'action des dikéto acides, dont le 5-CITEP, le S-1360 et le L-870810, semble impliquer l'interaction entre le carboxylate des dikéto-acides et les ions métalliques du site actif de l'intégrase. Bien que le nombre et la nature des ions métalliques requis pour l'activité intégrase reste controversé, il a été proposé que le mécanisme d'intégration implique deux cations divalents dans le site catalytique de l'enzyme (130, 255). Le premier cation est coordonné par les résidus D64 et D116, le second serait coordonné soit par le D116 et le E152 (284) ou soit par le E152, le N155 et la dernière adénosine de l'ADN viral clivée en 3' (255).

Les DKAs chélatraient les deux cations métalliques via une interaction directe avec les oxygènes de la portion dikéto de la molécule (130, 220, 255). Ainsi, la séquestration fonctionnelle des cofacteurs métalliques serait à l'origine de l'inhibition.

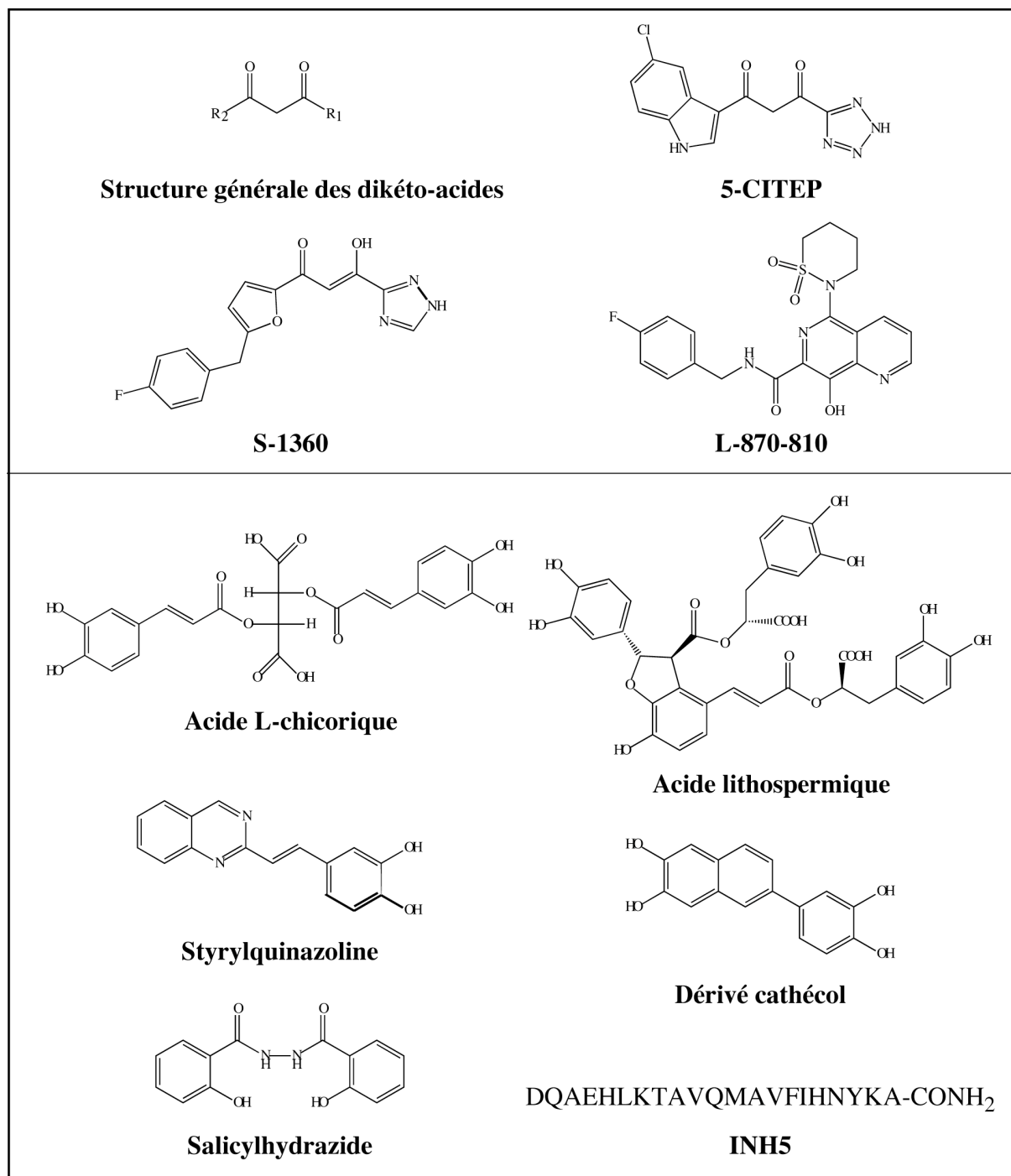


Figure 39 : Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.

D'autres pistes sont explorées, mais le principal inconvénient provient de la forte toxicité de la plupart des molécules testées. Parmi les inhibiteurs synthétiques en développement, on distingue (Figure 39) les dérivés de l'acide L-chicorique (284), les styrylquinolines (23, 83, 354) et styrylquinindines, les salicylhydrazides (247) ou encore des dérivés rigides et semi-rigides des catechol et bis-catechol (96). Plusieurs inhibiteurs naturels provenant de champignons ou de microbes ont récemment été étudiés dont l'acide lithospermique (Figure 39) de *Salvia miltiorrhiza*, qui inhibe les deux réactions catalysées par l'intégrase du VIH-1, à des concentrations sous-micromolaires (IC_{50}) (1). La forte activité, la spécificité ainsi que la faible cytotoxicité de ces molécules en font des composés prometteurs.

Des peptides synthétiques mimant entre autres, l'hélice α -1 ou α -5, qui forment l'interface de dimérisation des sous-domaines «core» de différents monomères d'intégrase, ont également été mis au point. Le plus actif de ces peptides, INH5 (Figure 39) (222), inhibe les activités 3'processing et de transfert avec une IC_{50} de 0,085 et 0,06 μ M, respectivement. Il lie le domaine «core» de la protéine et induit la dissociation des oligomères d'intégrase. Un autre petit peptide (FHNHGKQ), identifié par la méthode de phage display, inhibe spécifiquement la réaction de transfert (85). Cet inhibiteur, ainsi que le peptide EBR28 (76), entre en compétition avec l'ADN substrat pour la liaison à l'IN.

Le développement de banques d'anticorps monoclonaux (22) à l'encontre de l'IN ainsi que l'inhibition de celle-ci à l'aide l'oligonucléotides (31, 77) sont également en cours de développement.

2. Les approches vaccinales

Malgré une soixantaine d'essais cliniques (pour revue voir (117, 211), aucun vaccin préventif ou thérapeutique n'a encore vu le jour. Les stratégies de mise au point de vaccin étant nombreuses, seules quelques pistes seront présentées.

Récemment, la firme Vaxgen (<http://vaxgen.com>) a présenté les résultats des essais du premier vaccin préventif anti-VIH en phase clinique III (Tableau 3) (330). Le mode opératoire consiste à injecter, dans un premier temps, un vaccin qui utilise le virus canarypox comme vecteur d'antigènes du VIH-1 (ALVAC d'Aventis-Pasteur) et qui stimule l'immunité cellulaire. Un rappel par un vaccin de la firme Vaxgen (AIDSVAX), constitué d'un monomère recombinant de gp120, est ensuite effectué afin de stimuler

l'immunité humorale. Les résultats se sont révélés très décevants et ils ont montré la complète inefficacité du vaccin AIDSVAX (330).

L'institut Pasteur (<http://www.pasteur.fr/actu/presse/dossiers/sida/index.html>) développe également une approche vaccinale qui fait intervenir un virus atténué de la rougeole. Celui-ci confère une très bonne immunité contre la rougeole, à vie et suite à une seule injection. Le but est de mettre au point un vaccin mixte VIH-rougeole, «*recombinant*», en introduisant deux à trois gènes du VIH-1 dans l'ADN du virus atténué de la rougeole. Les protéines du VIH seraient alors exprimées à la surface du virus de la rougeole. Cependant, la plupart des adultes sont déjà protégés contre la rougeole et ce vaccin serait à visée essentiellement pédiatrique. Les premiers essais réalisés chez la souris sont encourageants et un essai clinique chez l'homme est en préparation. Il devrait permettre de tester la tolérance du vaccin, sa sûreté ainsi que sa capacité à induire une réponse immunitaire chez des individus déjà pré-immunisés contre la rougeole. Une autre piste consistant à utiliser le vaccin BCG (Bacille de Calmette-Guérin) comme vecteur des antigènes du VIH-1 est également étudiée.

L'utilisation de peptides dans les préparations vaccinales est une approche alternative à l'utilisation des vecteurs recombinants et présente un faible niveau de risque comparés aux vaccins composés de virus recombinants ou atténués.

Depuis 1994, l'ANRS (<http://www.anrs.fr>) développe une stratégie vaccinale qui repose sur l'utilisation de lipopeptides et qui vise à obtenir une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les lipopeptides sont des molécules hybrides, constituées de larges fragments synthétiques de protéines virales associés à une chaîne lipidique monopalmitoylée. La partie lipidique permet d'accroître l'immunogénicité du peptide et lui assure une meilleure pénétration dans les cellules présentatrices de l'antigène, favorisant la réponse immunitaire à médiation cellulaire. À titre d'exemple, des essais vaccinaux ont montré d'une part une réponse cellulaire fortement induite, de longue durée (supérieure à 2 ans) et reproductible chez un nombre significatif de sujets vaccinés (ANRS VAC04) (263), et d'autre part que les lipopeptides peuvent induire un effet de rappel (ANRS VAC09) (111). Les résultats obtenus par cette approche sont encourageants.

Parallèlement aux vaccins préventifs, l'ANRS s'est engagée dans une approche thérapeutique originale, la vaccinothérapie. Elle consiste à utiliser des préparations vaccinales afin d'induire et d'amplifier les réponses immunitaires anti-VIH chez un patient infecté par le VIH. L'objectif est d'obtenir un meilleur contrôle de la réplication virale par le système immunitaire. La vaccinothérapie est envisagée en complément des traitements antirétroviraux et pourrait permettre aux patients de bénéficier de périodes d'arrêts prolongés des traitements. Plusieurs essais (Vacciter (324), Vaccil-2 (203)) ont été effectués et utilisent soit des vecteurs viraux comme le canarypox (Alvac), soit des lipopeptides.

Phase I	Recherche de toxicité	Administration unique Doses répétées	Faible taille d'échantillon Durée brève	Volontaire sain (VS) Centre spécialisé Etude sans bénéfice direct**	Premières administrations à l'homme
Phase II	Recherche d'activité (PD) Recherche de doses Pharmacocinétique (PK) Modélisation PK/PD Interactions (médicament; alimentation) Pharmacogénétique	Administrations répétées	Faible taille d'échantillon Durée brève	Ila: VS (jeune; âgé) Iib: malade Centre spécialisé Etude sans bénéfice direct (IIa)	Définition des propriétés PK et PD du produit Validation des critères intermédiaires
Phase III	Essai comparatif thérapeutique	Comparaison d'1 ou 2 posologies vs placebo ou produit de référence	Grands échantillons Durée longue	Malades mono ou multicentrique	Preuve d'efficacité et /ou de supériorité du produit Vérification statistique de l'hypothèse
Phase IV et Post AMM*	Nouvelle indication Pharmacoépidémiologie Pharmacovigilance Etude physiopharmacologique Pharmacoeconomie				

*AMM : Autorisation de mise sur le Marché

**Etude sans bénéfice direct: l'objet d'étude est, *stricto sensu*, le médicament.

Tableau 3 : Les différentes phases d'essais cliniques.

3. L'utilisation de microbicides

En raison de l'augmentation du mode de transmission hétérosexuel du VIH-1, l'infection se féminise de plus en plus, si bien qu'à présent près de la moitié des individus infectés sont des femmes. Une approche visant à contrecarrer l'absence de vaccin et de traitement prophylactique efficace consiste à développer des agents anti-VIH sous une formulation topique intravaginale et intrarectale. Leur action au niveau des muqueuses doit conduire à inactiver le virus, à empêcher sa fixation (331), son entrée ou sa réplication. Ils doivent agir sur les étapes se situant avant l'intégration du génome proviral et ceci sans avoir besoin d'activation métabolique cellulaire. Leur action doit être rapide, durable, et appropriée aux conditions physiologiques de la zone d'application. En outre ils doivent pouvoir être utilisés quotidiennement sans être irritants ou toxiques pour les muqueuses. La stabilité de ces molécules dans des climats difficiles, l'aspect général du gel ainsi que les moyens de se le procurer sont des éléments clés du succès de ce type de formulation.

Les composés actifs de ces microbicides sont entre autres des polymères anioniques (PRO 2000), des protéines (cyanovirin-N) ou des inhibiteurs de RT (DABO, UC-781) (325, 355). Près de 60 molécules présentent une activité anti-VIH *in vitro* et 18 sont en phase d'essais cliniques (66). Le PRO 2000 (Indevus Pharmaceuticals) et le BufferGel (Reprotect) subissent actuellement des essais internationaux conduits par le réseau d'essai du NIH (NIH's HIV Prevention Trials Network HPTN, <http://www2.niaid.nih.gov/newsroom/Releases/2microbicides.htm>). Le PRO 2000 inhibe l'entrée du virus en interférant avec l'étape de reconnaissance entre gp120 et CD4 tandis que le BufferGel augmente l'acidité naturelle du vagin en présence de liquide séminal.

L'absence de données relatives à leur toxicité au niveau des muqueuses, à leur potentiel carcinogène ainsi qu'à leur biodisponibilité reste le principal inconvénient à leur utilisation.

4. Les autres inhibiteurs en développement ((75), figure 40)

- Les inhibiteurs d'adsorption virale, composés d'une grande variété de molécules polyanioniques. Tous ces composés, synthétiques ou naturels exercent leur activité antivirale en masquant les sites chargés positivement de la boucle V3 de gp120. Ces sites étant nécessaires à l'attachement du virus à la surface cellulaire (242). Leur principale utilisation envisagée est sous forme de virucides/microbicides (cf. II. B. 6)

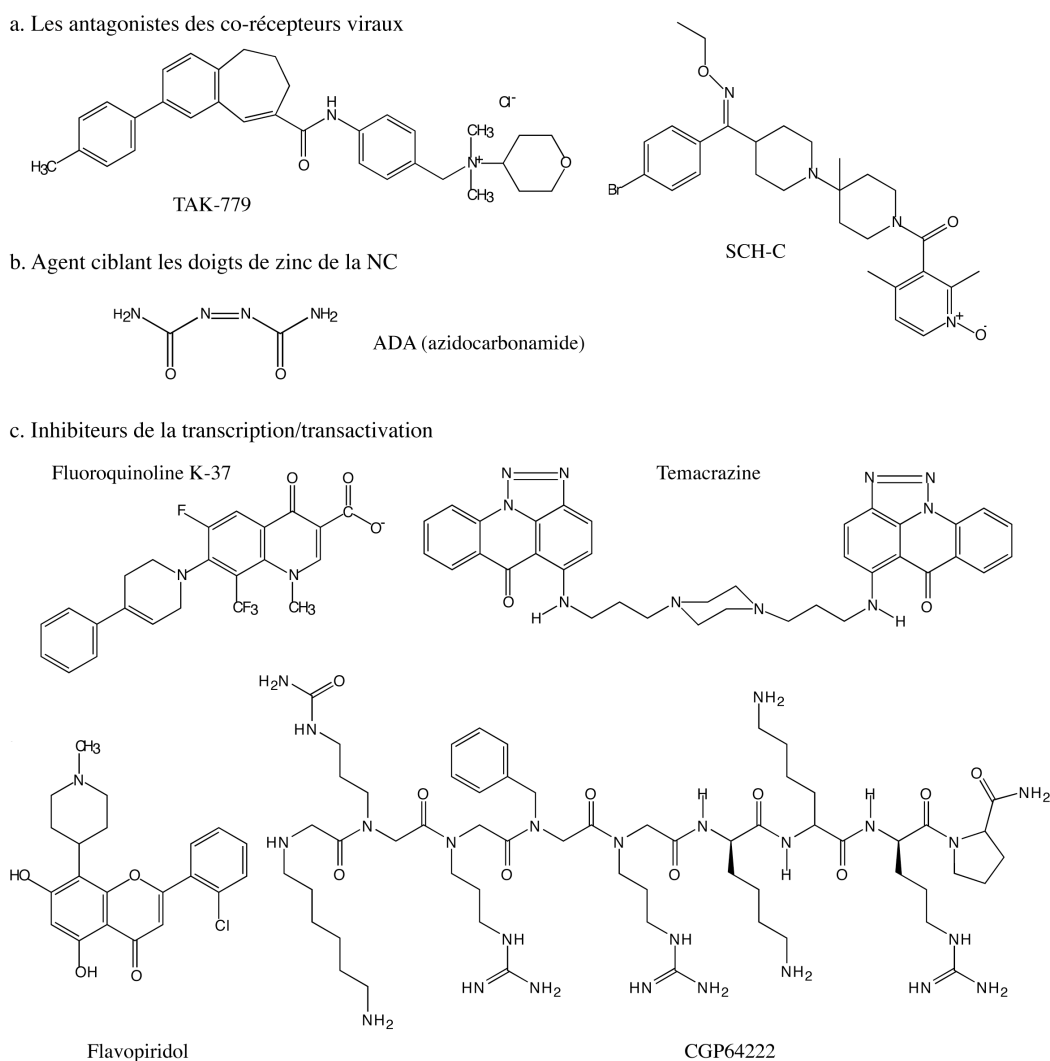


Figure 40 : Structure de molécules étudiées dans de nouvelles stratégies anti-VIH.

- *Les antagonistes des co-récepteurs viraux TAK-779 et SCH-C* (Figure 40). Suite à l'interaction gp120/CD4, les particules virales doivent interagir avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4 pour pouvoir entrer dans la cellule hôte. Il est possible d'utiliser des molécules antagonistes de ces corécepteurs afin d'inhiber cette étape (138). Cette possibilité provient de l'observation que les ligands naturels de ces corécepteurs, SDF-1 pour CXCR4 ainsi que RANTES, MIP-1 α et MPI-1 α pour CCR5 inhibent respectivement l'entrée des virus T et M-tropiques (210) (Figure 41).

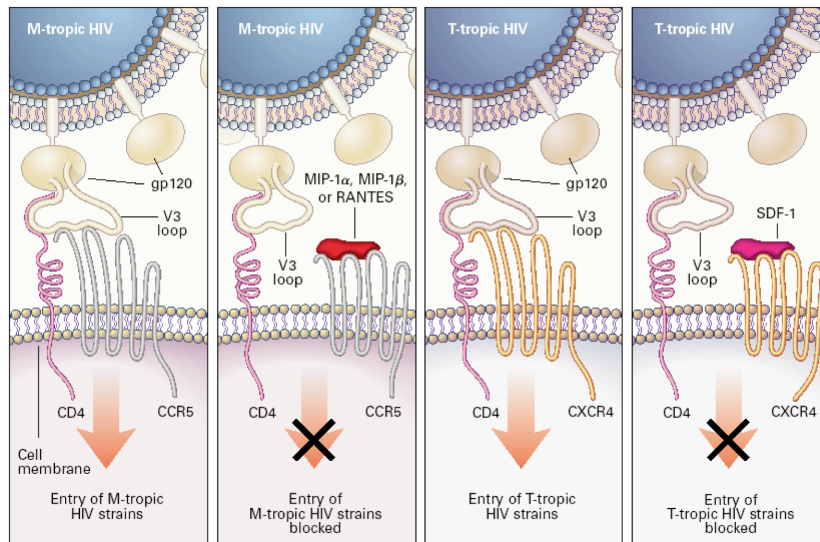


Figure 41 : Inhibition de l'entrée des virus M et T tropiques par les ligands naturels des co-récepteurs viraux CCR5 et CXCR4 (d'après (210)).

- *Les agents ciblant les doigts de zinc de la NC* Les composés précurseurs sont le NOBA (3-nitrosobenzamide), le DIBA (2,2'-dithiobisbenzamide), les dithianes et l'ADA (azodicarbonamide) (Figure 40). Ils seraient capables d'interférer avec des étapes précoces (décapsulation et désassemblage) et tardives (packaging et assemblage) du cycle répliatif en éjectant les atomes de zinc présents au niveau des deux doigts de zinc conservés de la NC. Bien qu'ils adoptent une conformation parfaitement adaptable aux doigts de zinc de la NC et qu'ils semblent ne pas affecter ceux des protéines cellulaires, ils ne présentent pas un index de sélectivité important (155). L'ADA a été le premier mais également l'unique composé de cette classe à être testé en phase clinique I/II (Tableau 3).

- *Inhibiteurs de transcription/transactivation* (Figure 40) : Plusieurs cibles peuvent être la source d'une inhibition de la transcription du VIH-1. Des effets inhibiteurs ont été observés, au niveau de la transcription basale, par l'utilisation de composés interagissant avec le promoteur LTR du VIH-1 ou avec les facteurs de transcription cellulaire s'y fixant. Des exemples de ces deux types d'inhibiteurs sont la témacrazine (326) d'une part et les dérivés de la fluoroquinoline (K-12 et K-37) (11) ainsi que les inhibiteurs de NF- κ B (67) d'autre part. Néanmoins, il est possible d'obtenir une plus grande spécificité par l'utilisation de molécules qui ciblent la transactivation de la transcription par la protéine Tat (67). Il s'agit entre autres des analogues peptidiques de Tat (CGP64222) (178) ou encore du flavopiridol qui est un inhibiteur de P-TEFb et des kinases cycline-dépendantes (47).

Enfin, une étude menée en Afrique du sud a montré que la circoncision masculine engendre un niveau de protection contre la transmission du VIH-1 de l'ordre de 65 % (62). Néanmoins, l'efficacité de cette méthode préventive, au même titre que l'utilisation de microbicides, de préservatifs ou de diaphragmes, reste intimement liée au comportement sexuel des individus. Le dilemme est qu'elles peuvent induire une désinhibition comportementale.

Objectifs du travail de thèse

Depuis plusieurs années, de nombreux laboratoires s'intéressent aux mécanismes d'inhibition et de résistance de la RT du VIH-1 (pour revue voir (88, 122)). Les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces en raison de l'apparition de mutations de résistance qui confèrent une grande capacité d'échappement du virus aux anti-rétroviraux. Le seul moyen d'améliorer la lutte contre le virus consiste par conséquent à trouver de nouvelles stratégies d'inhibition, en élargissant la panoplie des antiviraux disponibles, et en identifiant de nouvelles cibles et de nouveaux mécanismes d'action. Notre laboratoire s'oriente, entre autres, vers le développement de nouveaux inhibiteurs de la RT ayant un mode d'action original.

Dans cette optique, nous avons étudié une nouvelle classe de composés non analogues de nucléosides : les 3,7-dihydroxytropolones (3,7 DHT) (Figure 42 et tableau 4). En 1997, l'équipe du Pr. S.Piettre (IRCOF, Rouen, France) a montré que certaines 3,7 DHT inhibent l'inositol monophosphatase (IMPase) par chélation des deux ions Mg^{2+} catalytiques, distants de 3.7 Å dans le site actif de l'enzyme (264) (Figure 42). Ces composés entrent en compétition avec l'inositol monophosphate (IMP), substrat naturel de l'enzyme, en se fixant dans la cavité de liaison du groupement phosphate de l'IMP. Les conditions nécessaires à une telle inhibition ont été définies comme étant : la présence d'au moins une fonction hydroxyle (en C2 ou C7) contiguë à l'oxygène constitutif du noyau cycloheptatriènone, l'absence de modification du ou des hydroxyles (O2 et O7) et leur déprotonation ainsi qu'une distance d'environ 3,7 Å entre les deux ions Mg^{2+} .

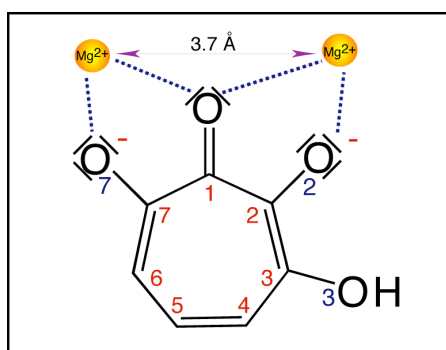


Figure 42 : Structure de la 3,7dihydroxytropolone SP15 et inhibition par chélation des ions Mg^{2+} (d'après (264))

L'inhibition par chélation des ions Mg^{2+} nécessite : la présence d'un groupement hydroxyle déprotoné et non modifié en C2 et/ou C7 de la molécule, ainsi que la présence de 2 cations divalents distants d'environ 3.7 Å. Les traits bleus en pointillés représentent les liaisons de coordination. Les différentes 3,7 DHT testées dérivent du composé parent SP15, représenté ci-contre, par différentes substitutions aux positions O2, O7, C2, C3, C4, C5, C6 et C7 (Tableau 4).

La RT du VIH-1 contient deux ions Mg^{2+} dans les sites catalytiques polymérase et RNase H. Ils sont respectivement distants de 3.57 Å (153) et 4 Å (72) et pourraient ainsi autoriser un mode d'inhibition par chélation des ions Mg^{2+} . En outre, l'IN du VIH-1 possède dans son site actif une plate-forme proche de celle du site RNase H de la RT du VIH-1. Par conséquent, ces observations nous ont amené à tester l'effet des 3,7-DHT sur les activités de la RT et de l'IN du VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons examiné l'aptitude des 3,7-DHT à inhiber spécifiquement les activités polymérase et RNase H de la RT. Leur capacité à inhiber les activités de l'IN, \square processing et transfert de brin, a été étudiée en collaboration avec le laboratoire du Dr. JF.Mouscadet (ENS Cachan, Paris, France). Nous avons ensuite entrepris des études enzymatiques plus détaillées afin de déterminer les paramètres de l'inhibition de l'activité polymérase par les 3,7-DHT.

Par ailleurs, nous avons voulu confirmer le mode d'inhibition original de ces molécules. Dans ce but, nous avons étudié, *in vitro*, l'inhibition de la synthèse d'ADN en fonction de différentes concentrations en Mg^{2+} . Dans la même optique, nous avons pour projet d'obtenir la structure aux rayons X d'un complexe ternaire (A/M):RT:dNTP, en présence d'une 3,7-DHT. Cette approche a requis le pontage d'un complexe A/M à la RT, sur la base de travaux publiés dans un premier temps par le groupe du Dr G.Verdine (Harvard University, Cambridge, USA) (154) puis du Dr E.Arnold (Rutgers University, Piscataway, USA) (290). Nous avons également analysé d'autres modes d'inhibition possibles, comme la fixation des 3,7-DHT aux acides nucléiques (avec S.Bernacchi), au site de liaison des NNRTIs ou encore une inhibition de l'activité polymérase par dissociation de la forme hétérodimérique de la RT. De plus, une collaboration avec le laboratoire du Dr. M.Götte (Mc Gill University, Montréal, Québec) a permis d'examiner l'effet des 3,7-DHT sur l'étape de translocation de la RT, lors de la polymérisation.

Nous avons également étudié l'inhibition des activités de l'IN du VIH-1 en fonction du cation catalytique utilisé, Mn^{2+} ou Mg^{2+} .

Enfin, compte tenu de l'existence de nombreuses enzymes bimétalliques cellulaires, nous avons voulu savoir si de telles molécules sont capables d'inhiber efficacement la réplication virale en culture cellulaire. Des tests de toxicité et d'inhibition

de ces molécules de première génération ont été effectués en collaboration avec le laboratoire du Dr A.M Aubertin (Institut de Virologie, Strasbourg, France).

Une autre partie du travail de thèse a consisté à étudier l'effet de la concentration du Mg^{2+} libre lors des réactions de rétrotranscription (avec V. Goldschmidt). *In vitro*, les études d'inhibition de l'activité polymérase et RNase H sont généralement réalisées en présence de 6 mM de Mg^{2+} , ce qui permet d'obtenir une activité polymérase et RNase H optimale. Cependant cette situation ne reflète pas les conditions intracellulaires réelles où une partie du Mg^{2+} est liée aux acides nucléiques et aux nucléotides. Ainsi les concentrations en Mg^{2+} libre dans le sang (335), dans le cerveau (119) et dans les lymphocytes (79, 80) sont respectivement d'environ 0,25 à 0,75, 0,2 et 0,25 mM. De plus, il a été montré que l'AZTTP et le d4TTP nécessitent de plus importantes concentrations en Mg^{2+} que le dTTP pour une incorporation optimale, pointant l'importance de ce paramètre (87).

Dans cette optique, nous avons évalué l'effet de la concentration en Mg^{2+} libre sur les activités polymérase et RNase H ainsi que sur l'inhibition de la synthèse d'ADN «strong-stop» (-) par des inhibiteurs nucléosidiques. Les différences de concentration en Mg^{2+} libre, dans différents types cellulaires ou durant le cycle cellulaire, pourraient affecter fortement la réplication du VIH-1 et son inhibition par les NRTIs. Ainsi, nos résultats ont d'importantes implications pour le criblage et le test de NRTIs potentiels.

Nous nous sommes également intéressés à l'initiation de la réplication du virus de l'hépatite C (VHC). Le VHC est un hépacivirus constitué d'un ARNg simple brin de polarité (+) non cappé ni polyadénylé et il se réplique par l'intermédiaire d'un ARN de polarité (-). Il code pour sa propre ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B), obtenue suite au clivage d'un précurseur polyprotéique synthétisé *via* un mécanisme de traduction par entrée interne des ribosomes.

Les structures 2D des extrémités 3'UTR (+) et (-) des ARNv, où démarre la réplication, ont été déterminées (162, 295). Notre objectif est d'identifier les sites de démarrage de la réplication par cartographie en solution, à l'aide d'une sonde chimique, le plomb Pb^{2+} , qui génère des coupures dans les régions simple brin et les sites de fixation d'ions divalents des acides nucléiques. Les plasmides codants pour les extrémités 3'UTR (+) et (-) (fournis par C.Schuster, Institut de Virologie, Strasbourg) ont permis la synthèse de différents fragments d'ARN contenant tous ou partie des extrémités 3'UTR (+) et (-). La protéine NS5B (clone provenant de B.Canard, AFMB, Marseille) a été surproduite au laboratoire et la présence d'une activité polymérase efficace a été testée. Nous avons réalisé l'empreinte de NS5B sur différents ARNs. Néanmoins, les résultats de ces expériences, encore trop préliminaires, ne seront pas discutés dans ce manuscrit.

Monosubstitués			
en position 4	en position 5	disubstitués aux positions 4 et 6	
<p>Non modifiés</p> <p>SP2 </p> <p>SP3 </p> <p>SP4 </p> <p>SP5 </p> <p>SP6 </p> <p>SP7 </p> <p>SP8 </p> <p>SP9 </p> <p>SP10 </p> <p>SP11 </p> <p>SP12 </p> <p>SP13 </p> <p>SP14 </p> <p>SP15 </p> <p>SP16 </p> <p>SP17 </p> <p>SP18 </p> <p>SP19 </p> <p>SP20 </p> <p>SP21 </p> <p>SP22 </p> <p>SP23 </p> <p>SP24 </p> <p>SP25 </p> <p>SP26 </p> <p>SP27 </p> <p>SP28 </p> <p>SP29 </p> <p>SP30 </p> <p>SP31 </p> <p>SP32 </p> <p>SP33 </p> <p>SP34 </p> <p>SP35 </p>	<p>acétylés</p> <p>SP1 </p> <p>SP2 </p> <p>SP3 </p> <p>SP4 </p> <p>SP5 </p> <p>SP6 </p> <p>SP7 </p> <p>SP8 </p> <p>SP9 </p> <p>SP10 </p> <p>SP11 </p> <p>SP12 </p> <p>SP13 </p> <p>SP14 </p> <p>SP15 </p> <p>SP16 </p> <p>SP17 </p> <p>SP18 </p> <p>SP19 </p> <p>SP20 </p> <p>SP21 </p> <p>SP22 </p> <p>SP23 </p> <p>SP24 </p> <p>SP25 </p> <p>SP26 </p> <p>SP27 </p> <p>SP28 </p> <p>SP29 </p> <p>SP30 </p> <p>SP31 </p> <p>SP32 </p> <p>SP33 </p> <p>SP34 </p> <p>SP35 </p>	<p>autres modifications</p> <p>SP1 </p> <p>SP2 </p> <p>SP3 </p> <p>SP4 </p> <p>SP5 </p> <p>SP6 </p> <p>SP7 </p> <p>SP8 </p> <p>SP9 </p> <p>SP10 </p> <p>SP11 </p> <p>SP12 </p> <p>SP13 </p> <p>SP14 </p> <p>SP15 </p> <p>SP16 </p> <p>SP17 </p> <p>SP18 </p> <p>SP19 </p> <p>SP20 </p> <p>SP21 </p> <p>SP22 </p> <p>SP23 </p> <p>SP24 </p> <p>SP25 </p> <p>SP26 </p> <p>SP27 </p> <p>SP28 </p> <p>SP29 </p> <p>SP30 </p> <p>SP31 </p> <p>SP32 </p> <p>SP33 </p> <p>SP34 </p> <p>SP35 </p>	<p>Composés parents</p> <p>SP1 </p> <p>SP2 </p> <p>SP3 </p> <p>SP4 </p> <p>SP5 </p> <p>SP6 </p> <p>SP7 </p> <p>SP8 </p> <p>SP9 </p> <p>SP10 </p> <p>SP11 </p> <p>SP12 </p> <p>SP13 </p> <p>SP14 </p> <p>SP15 </p> <p>SP16 </p> <p>SP17 </p> <p>SP18 </p> <p>SP19 </p> <p>SP20 </p> <p>SP21 </p> <p>SP22 </p> <p>SP23 </p> <p>SP24 </p> <p>SP25 </p> <p>SP26 </p> <p>SP27 </p> <p>SP28 </p> <p>SP29 </p> <p>SP30 </p> <p>SP31 </p> <p>SP32 </p> <p>SP33 </p> <p>SP34 </p> <p>SP35 </p>

Tableau 4 Structures des différents composés testés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Inhibition de la rétrotranscriptase et de l'intégrase du VIH-1 par les 3,7-dihydroxytropolones

I. Objectifs

L'objectif de cette première partie est d'étudier l'effet global des 3,7-DHT sur les activités polymérase et RNase H de la RT, ainsi que sur les activités de processing et de transfert de l'IN du VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons étudié une première série de 16 composés (Tableau 4) (SP1 à SP16) sur l'activité polymérase et RNase H de la RT, certains étant monosubstitués en position 4 (SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6), disubstitués en positions 4,6 (SP7, SP8, SP9), acétylés (SP12) ou méthylés (SP13, SP14) aux positions O2 et O7. Deux tropolones modifiées (SP10, SP11), une carboxytropolone (SP16) ainsi que le composé parent SP15 ont également été étudiés. Les résultats obtenus nous ont ensuite conduit à étudier un plus grand nombre de couples de composés SP monosubstitués/disubstitués (SP2/SP48, SP5/SP45, SP47/SP7, SP46/SP9), de composés substitués en position 5 (SP18, SP19, SP25, SP28, SP32), ou acétylés en O2 et O7 et substitués en position 5 (SP17, SP21, SP22, SP23, SP24, SP29, SP30, SP35) (Tableau 4), sur l'activité polymérase. Enfin, le composé SP20, homologue acétylé de SP15 a été synthétisé par l'équipe du Pr. S.Piettre.

En outre, un séjour au sein du laboratoire du Dr. JF. Mouscadet (LBPA, ENS Cachan, Paris) nous a permis d'étudier l'effet de la première série de composés SP sur les activités de processing et de transfert de l'IN du VIH-1. La technique a ensuite été importée dans notre laboratoire afin d'y tester l'effet d'autres composés.

Nous avons également mis en évidence quelques indices de l'implication des cations catalytiques dans le mécanisme d'inhibition par les 3,7-DHT (Figure 42). Enfin, la toxicité en culture cellulaire de ces composés a également été évaluée, dans le laboratoire du Dr. A.M. Aubertin (Institut de virologie, Strasbourg).

Publication en cours de révision pour Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC).

Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase, RNase H, and Integrase Activities by Hydroxytropolones

Joël Didierjean¹, Catherine Isel¹, Flore Querré², Jean-François Mouscadet³, Anne-Marie Aubertin⁴, Jean-Yves Valnot², Serge R. Piettre² and Roland Marquet^{1,*}

¹Unité Propre de Recherche 9002 du CNRS conventionnée à l'Université Louis Pasteur, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France; ² Laboratoire des Fonctions Azotées et Oxygénées Complexes, Unité Mixte de Recherche 6014 du CNRS, IRCOF, Université de Rouen, rue Tesnière, 76821 Mont St Aignan cedex, France; ³ LBPA, Unité Mixte de Recherche 8113 du CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France; ⁴ Unité Mixte de Recherche 544 INSERM-Université Louis Pasteur, Institut de Virologie, 67000 Strasbourg, France.

* Corresponding author: Phone: +333 88 41 70 35

Fax: +333 88 60 22 18

E-mail: r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr

Running title: Inhibition of HIV-1 RT and IN by Hydroxytropolones

ABSTRACT

HIV-1 reverse transcriptase (RT) possesses distinct DNA polymerase and RNase H sites, whereas integrase (IN) uses the same active site to perform 3'-end processing and strand transfer of the proviral DNA. These four enzymatic activities are essential for viral replication and require metal ions. Two Mg^{2+} are present in the RT polymerase site, and one or two Mg^{2+} ions are required for the catalytic activities of RNase H and IN. We tested the possibility to inhibit the RT polymerase and RNase H, as well as the IN 3'-end processing and transfer activities of purified enzymes by a series of 3,7-dihydroxytropolones designed to target two Mg^{2+} ions separated by ~ 3.7 Å. The RT polymerase and IN 3'-processing activities were inhibited at submicromolar concentrations, while the RNase H and IN strand transfer activities were inhibited in the low micromolar range. In all cases, the lack of inhibition by tropolones and *O*-methylated 3,7-dihydroxytropolones was consistent with the inhibitors binding the metal ions in the active site. In addition, inhibition of the DNA polymerase activity was shown to depend on the Mg^{2+} concentration. Furthermore, selective inhibitors were identified for several of the activities tested, leaving some potential for design of better second generation inhibitors. However, all tested compounds exhibited cellular toxicity that presently limits their applications.

INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Synthesis and integration of the HIV-1 proviral DNA into the host cell genome are the result of four catalytic activities. The virally encoded reverse transcriptase (RT) contains polymerase and RNase H active sites [1, 15, 22], whereas the integrase (IN) possesses 3'-end processing and strand transfer activities achieved by the same catalytic site [6, 18]. All four activities are essential for HIV-1 replication, but only the polymerase is currently targeted by FDA-approved inhibitors. Several drugs inhibiting the IN strand transfer activity have proceeded to clinical trials [10].

Combinations of RT and protease inhibitors offer highly effective durable treatment options [10]. However, the high incidence of resistance in therapy-experienced and newly infected patients underscores the need for new antiretroviral agents [11, 17, 32, 51]. Increasing the number of anti-AIDS drugs would also facilitate the management of their side-effects [37].

One strategy to minimize the emergence of drug resistance may be the design of compounds that would interact with amino acids or cofactors that are essential for catalysis. A common feature of the RT and IN catalytic activities is the requirement of a metal cofactor, which is most likely Mg^{2+} *in vivo*. Two Mg^{2+} ions separated by 3.57 Å have been observed in the polymerase active site of RT in complex with a primer/template DNA duplex and an incoming nucleotide [27]. The three aspartate residues that bind Mg^{2+} and the metal ions themselves are essential for DNA synthesis [28, 40].

Divalent metal ions, such as Mg^{2+} or Mn^{2+} , are also essential for HIV-1 RNase H activity [7], but the number of ions involved in the RNA cleavage reaction is still unclear. Two Mn^{2+} ions separated by 4 Å and coordinated to D443, E478, D498, and D549 have been observed in the isolated HIV-1 RNase H domain [8], whereas only one Mg^{2+} ion, bound to D443 and D549, was seen in the RNase H domain of RT bound to a DNA duplex, in the presence of an incoming dNTP [27].

Similarly, IN activities require divalent metal ions [4, 30, 49], but the number of metal ions involved in catalysis is still subject to debate [23]. Structural studies of IN revealed a single binding site for Mg^{2+} and Mn^{2+} [20, 35], while two Cd^{2+} or Zn^{2+} ions separated by 3.6-

3.7 Å were observed [4, 5, 49]. Indeed, it is believed that a second Mg^{2+} ion is carried into the integrase active site by the substrate [31].

In this study, we tested the possibility to inhibit the RT polymerase and RNase H, and the IN 3'-end processing and transfer activities by compounds designed to target two Mg^{2+} ions separated by ~ 3.7 Å. To this aim, we used 3,7-dihydroxytropolones (Fig. 1), which have been shown to inhibit inositol monophosphatase by binding the Mg^{2+} ions of the catalytic site, thus preventing binding of the substrate [41, 42]. To our knowledge, this is the first time that this strategy is used to inhibit the polymerase activity of HIV-1 RT, and there is only one published rational attempt to simultaneously target two metal ions in the RNase H active site [29]. While this work was in progress, it became increasingly likely that several IN inhibitor families identified by "blind" or focussed screening bind magnesium in the IN active site [12, 23, 39]. However, it is not completely clear whether these inhibitors bind one or two metal ions [19, 23]. Recently, a rationally-designed IN inhibitor that can bind two Mg^{2+} ions has been described [33].

In this study, we showed that the RT polymerase and IN 3'-processing activities are inhibited at submicromolar concentrations, while 3,7-dihydroxytropolones inhibited the RNase H and IN strand transfer activities in the low micromolar range. In all cases, the lack of inhibition by modified tropolones and *O*-methylated 3,7-dihydroxytropolones is consistent with the inhibitors binding the metal ions in the active site. In line with this mechanism, inhibition of the RT polymerase by 3,7-dihydroxytropolones and acetylated derivatives was very sensitive to the magnesium concentration. Furthermore, selective inhibitors were identified for several of the activities tested. Even though all tested compounds were toxic to cells, the numerous possibilities for derivatization of the dihydroxytropolone core potentially offers the possibility to increase the selectivity and decrease the toxicity of these inhibitors.

MATERIAL AND METHODS

Oligodeoxyribonucleotides

The sequence of the oligodeoxyribonucleotides used in this study is as follows: ODN: 5'-GTC CCT GTT CGG GCG GGA-3', ODN35: 5'-TTA GCC AGA GAG GCT CCC AGG CTC AGA TCT GGT CT-3', LE18: 5'-TAC GAA TTC TAA TAC GA CGA CTC ACT

ATA GGT CTC TCT GGT TAG ACC AGA TCT GAG C-3', U5B: 5'-GTG TGG AAA ATC TCT AGC AGT-3', U5B-2: 5'-GTG TGG AAA ATC TCT AGC A-3', and U5A: 5'-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC-3'. All oligodeoxyribonucleotides were purchased from Eurogentec (Belgium).

Templates, primers, and enzymes

RNA1-311 encompassing nucleotides 1 to 311 of HIV genomic RNA (MAL isolate) was used as template for RT assays. It was synthesized by *in vitro* transcription and purified as previously described [36].

The template used in RNase H assays was obtained by PCR with two partially complementary oligodeoxyribonucleotides generating a double stranded DNA containing the T7 RNA polymerase promoter upstream of the region coding for the nucleotides 1 to 47 of HIV genomic RNA (HxB2 isolate). Ten amplification cycles (30 s at 94°C, 30 s at 38°C, 30 s at 72°C) were performed with 100 pmoles of primers ODN35 and LE18, and 4U DyNAzyme™. The PCR product was purified on a 3% low-melting point agarose gel containing ethidium bromide. The band containing the transcription template was cut out under UV light and heated 20 min at 50°C in presence of phenol. The extracted DNA was ethanol precipitated and resuspended in water. RNA1-47 was *in vitro* transcribed and purified as above [36]. RNA1-47 (2 µg) was dephosphorylated with 2 U calf intestine phosphatase during 1h at 37°C in 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTE. After a phenol/chloroform extraction, RNA1-47 was ethanol precipitated and resuspended in water.

RNA1-47 and oligodeoxyribonucleotides ODN, U5B, and U5B-2 were 5'-end labeled with [γ-³²P]ATP (3000 Ci/mmol) and phage T4 polynucleotide kinase. ODN and RNA1-47 were purified on 8% denaturing polyacrylamide gels; U5B and U5B-2 were purified on a Microspin™ G-25 column (Amersham Bioscience).

In order to form the primer/template complexes, RNA1-311 and ODN, or RNA1-47 and ODN35, were first denatured in water for 2 min at 90 °C and chilled on ice. Nucleic acids were annealed at 70 °C for 20 min in 100 mM NaCl and cooled on ice for 30 min. To prepare the substrates for integrase, U5A was annealed to either U5B or U5B-2 in 100 mM NaCl by heating at 80 °C, followed by slow cooling.

An RNA1-47 ladder was prepared by incubating RNA1-47 (15 000 cpm) and 1 μ g yeast tRNA for 15 min at 90°C in 0.1 M NaHCO₃/Na₂CO₃. The RNA1-47 fragments were precipitated by addition of 0.2 M LiClO₄, and the pellet was resuspended in water.

Plasmid expressing wild type (wt) HIV-1 RT was kindly provided to us by Dr. Torsten Unge (Uppsala, Sweden), together with the protocols for protein overexpression and purification. RNase H(-) RT was obtained by introducing the E478Q mutation in this plasmid [44]. Wild type IN was expressed and purified as described [30].

The 3,7-dihydroxytropolones, mono- or disubstituted at positions 4 or 4,6 (referred to as the SP compounds (Fig. 2)) were synthesized as previously described [41]. Stock solutions (20 mM) were prepared in dimethyl sulfoxide. We checked that this solvent did not affect any of the tested enzymatic activities at the maximum concentration used in this study.

RT assays

Minus strand strong-stop DNA synthesis. Ten nM of ODN/RNA1-311 (primer/template) complex were preincubated at 37°C for 4 min with 30 nM HIV-1 RNase H(-) RT in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1mM dithioerythritol. Reverse transcription was initiated by addition of dNTP (50 μ M each), in the presence or absence of SP compounds. Reaction was stopped at times ranging from 30 s to 30 min by addition of one volume of formamide containing 50 mM EDTA, and the reaction products were analyzed on 8% denaturing polyacrylamide gels. Radioactivity was quantified with a BioImager BAS 2000 (Fuji) using the MacBAS 2.5 (Fuji) software.

Polymerase-dependent RNase H cleavage. Ten nM ODN35/RNA1-47 complex were added to 10 nM wt HIV-1 RT in presence or absence of SP compounds. RNase H assays were carried out for 15 s to 30 min and stopped by mixing an equal volume of formamide containing 50 mM EDTA. Cleavage products were resolved using denaturing 15% polyacrylamide gels and analyzed as described above.

IN assays

3'-end processing and strand transfer. Processing and strand transfer reactions were performed using 1.25 nM U5A/U5B and 6.25 nM U5A/U5B-2 DNA/DNA complexes, respectively, in a buffer containing 20 mM Hepes pH 7.2, 1 mM dithiothreitol and 10 mM

MgCl₂ or MnCl₂. The reactions were initiated by addition of 100 nM IN, and the mixtures were incubated at 37°C for up to 1h, in the absence or in the presence of SP compounds. Reactions were stopped by phenol/chloroform extraction. The DNA products were precipitated with ethanol, resuspended in water, and separated on denaturing 16% polyacrylamide gels. Gels were analyzed on a STORM 840TM Phosphorimager (Molecular Dynamics) and quantified with the Image QuantTM software.

Inhibition of viral replication and cytotoxicity assays

The origin of viruses and the techniques used for measuring inhibition of virus replication have been previously described [43]. Briefly, in MT-4 cells, determination of antiviral activity of the SP compounds was based on a reduction of HIV-1 IIB-induced cytopathogenicity, the metabolic activity of the cell being measured by the property of mitochondrial dehydrogenase to reduce yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to blue formazan. For CEM-SS cells, the production of HIV-1 LAI was measured by quantification of the RT activity associated with the virus particles released in the culture supernatant [38]. Infected MT-4 and CEM-SS cells were cultured in the presence of different concentrations of SP compounds for 5 days before virus-production determination. The IC₅₀ was derived from the computer generated median effect plot of the dose/effect data. In parallel experiments, cytotoxicity of the SP compounds was measured with the MTT test on uninfected cells after a 5 day incubation. The CC₅₀ is the concentration at which OD540 was reduced by 50 %.

RESULTS

Polymerase Activity

The effect of the SP compounds (Fig. 2) on HIV-1 RT activity was tested on the *in vitro* (-) strand “strong-stop” DNA synthesis. This DNA is the “run-off” reverse transcription product of a primer annealed to the PBS (Primer Binding Site). In this study, we used a labeled 18-mer DNA primer and RNA1-311, which corresponds to nts 1 to 311 of HIV-1 MAL genomic RNA, as template. In order to avoid complications due to concomitant inhibition of RNase H by some of the SP compounds (see below), an RNase H(-) RT was used in this assay. Twenty molecules (Fig. 2) have been tested at different concentrations and

(-) strand “strong-stop” DNA, which corresponds to a 178-nucleotide primer extension in the MAL isolate, was quantified after separation of the products by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Figure 3 shows an example of gels obtained with the SP2 and SP12 compounds. In the absence of SP compounds, (-) strand “strong-stop” DNA synthesis was efficient. When adding SP2, (-) strand “strong-stop” DNA synthesis was already inhibited by >50% at 1 μM , drastically reduced at 10 μM , and undetectable at 100 μM (Fig. 3). These experiments revealed that inhibition of DNA synthesis was sequence independent. Synthesis of intermediate products was also inhibited, the longer products disappearing first, at the expense of the shorter ones. At 100 μM SP2, only very short products were synthesized, and the product pattern was reminiscent of distributive polymerization.

The IC_{50} , representing the concentration inhibiting 50% of (-) strand “strong-stop” DNA synthesis, was determined for each compound using the 30 min data set and expressed as $\log(\text{IC}_{50})$ in Table 1. The parental SP15 compound was not the best inhibitor of the polymerase activity. Three monosubstituted compounds, SP2, SP5, and SP46 inhibited (-) strand “strong stop” DNA synthesis at low micromolar or submicromolar concentration, indicating that some R1 groups favor interaction of 3,7-dihydroxytropolones with RT. The monosubstituted compounds were generally more potent inhibitors of (-) strand “strong stop” DNA synthesis than the disubstituted ones (Table 1). Five pairs of mono- and disubstituted compounds with identical substituents can be directly compared. In three pairs (SP47/SP7, SP4/SP8, and SP5/SP45), the monosubstituted compound was 20 to 60 fold more efficient than its disubstituted counterpart, while for the other pairs (SP46/SP9 and SP2/SP48) the difference was only two to five fold.

Several compounds were totally inactive against the polymerase activity of HIV-1 RT. Notably, C7-modified tropolones (SP10, SP11), which have only two adjacent oxygens on the seven-membered ring, and the *O*-methylated 3,7-dihydroxytropolones (SP13, SP14) were inactive. These results were in keeping with our hypothesis that hydroxytropolones might inhibit the polymerase activity by interfering with the Mg^{2+} ions in the active site.

SP12 and SP20 inhibited (-) strand “strong stop” DNA synthesis, even though they were less potent inhibitors than SP15 (Fig. 3 and Table 1). For instance, SP20 was tenfold less efficient than the corresponding non acetylated compound. As for SP2, a sequence

independent inhibition pattern was observed (Fig. 3). Inhibition of the RT polymerase activity by SP12 and SP20 was unexpected, as the hydroxyl groups supposed to chelate the magnesium ions are acetylated in these compounds (Fig. 2). The first pK_a of SP15 is 6.7, and deprotonation of a hydroxyl group results in increased chelating potency [42]. Accordingly, acetylated hydroxytropolones were inactive against inositol monophosphatase [41, 42]. Thus, our results raised the possibility that some or all SP compounds inhibit the RT polymerase activity by an unpredicted mechanism.

To address this question and to gain insight into the role of Mg^{2+} chelation in the inhibition process, we studied the inhibition of (-) strand “strong stop” DNA synthesis by SP12 and SP15 at two different magnesium concentrations (Fig. 4). At 6 mM Mg^{2+} , the IC_{50} of SP15 was $3.2 \pm 0.5 \mu M$, while SP12 was about twofold less active ($IC_{50} = 7.6 \pm 0.5 \mu M$). Interestingly, the inhibition potency of these compounds dramatically decreased at low magnesium concentration: at 0.3 mM Mg^{2+} , the IC_{50} of SP15 was $19 \pm 1 \mu M$, while inhibition of (-) strand “strong stop” DNA synthesis by SP12 was hardly detectable (Fig. 4). These results suggest that the SP compounds can only bind the RT polymerase active site in the presence of Mg^{2+} ions, in agreement with an inhibition mechanism involving chelation of the catalytic ions.

RNase H activity

Two modes of RNase H cleavage have been described: a polymerase-dependent cleavage [21], directed by the 3'-end of the DNA strand, and a polymerase-independent mechanism guided by the 5'-end of the RNA template [48]. The first mode of cleavage is thought to occur in concert with DNA polymerization to degrade the genomic RNA during (-) strand DNA synthesis, while the second may contribute to the degradation of larger genomic RNA fragments left after DNA 3'-end directed cleavage and may also play a role in the formation and removal of the polypurine tract (PPT). During polymerase-dependent cleavage, the polymerase active site of the enzyme is positioned at the recessed 3'-end of the DNA strand (Fig. 5a). The RNase H active site is positioned approximately 17 nts from the polymerase active site, and its position from the 3'-end of the DNA determines the position of the primary cleavage. RT then repositions and makes a secondary cleavage 7-9 nts from the recessed 3' end of the DNA (Fig. 5a). We have tested this mode of cleavage using RNA1-47 as viral RNA and ODN35 as DNA.

As shown in Fig. 5b, both the primary (RNA29) and the secondary (RNA21) cleavage products accumulated over time in the absence of SP compounds. In addition, weaker primary cuts generated fragments 28 and 32 nucleotides in length (Fig. 5b). However, all degradation products progressively disappeared as the SP9 concentration was increased. Formation of the two major products was slightly slower at 1 μM , strongly inhibited at 10 μM and undetectable at 100 μM (Fig. 5b). Interestingly, the two cleavages were inhibited with the same efficiency. The SP compounds were tested for inhibition of the polymerase-dependent RNase H activity, and the results are summarized in Table 1.

The best inhibitor of RNase H was the disubstituted 3,7-dihydroxytropolone SP9. SP7 was also amongst the most active compounds. However, not all disubstituted SP compounds were potent RNase H inhibitors, as SP8 was almost inactive. Disubstituted 3,7-dihydroxytropolones displayed similar potency against polymerase and RNase H activities. By contrast, monosubstituted 3,7-dihydroxytropolones were systematically less active against RNase H than against polymerase activity. Several molecules had a rather good specificity for the polymerase activity: the IC_{50} of SP2, SP3, and SP4 against polymerase was 20 to 35 fold lower than against RNase H (Table 1). However, none of the tested compounds displayed a high specificity for the RNase H activity, and only SP9 was significantly more efficient than the parent compound.

The C7-modified tropolones SP10, SP11, and the methylated 3,7-dihydroxytropolones SP13 and SP14 that did not inhibit the RT polymerase activity were also inactive against RNase H. Interestingly, the acetylated dihydroxytropolones SP12 and SP20 that were moderate polymerase inhibitors were weaker RNase H inhibitors (Table 1). In view of the results obtained previously with inositol monophosphatase [41, 42], these data suggest that hydroxytropolones inhibit the RT RNase H activity by binding the Mg^{2+} ions in the active site.

Integrase activities

The structures of the HIV-1 RNase H domain and the IN core present strong similitude, and their enzymatic mechanisms are probably also closely related [16, 50]. Thus, it was interesting to test the effects of the SP compounds on the 3'- processing and strand transfer activities of HIV-1 IN. To this end, we constructed a DNA duplex corresponding to the U5 region of the 3' LTR of the proviral DNA (Fig. 6a). Both reactions consist in a

nucleophilic attack of a phosphodiester bond by a hydroxyl group and require either Mg^{2+} or Mn^{2+} as a cofactor. During the processing reaction, the enzyme removes two 3'-nts at each terminus of the proviral DNA, resulting in overhanging CA ends (Fig. 6a). In the following strand transfer reaction, the 3'-processed end performs a nucleophilic attack on a phosphodiester bond of the target DNA [6]. In the *in vitro* assay with purified IN, the pre-processed 3'-end is randomly integrated in the target duplex (Fig. 6a).

3'-end processing

Figure 6b shows the results of 3'-end processing inhibition by SP2, SP9 and SP15. Processing of the 21-mer duplex liberates the 3'-terminal dinucleotide GT and the processed U5B oligonucleotide (U5B-2). The IN activity was assayed in the presence of increasing SP concentrations. As shown on the 15% polyacrylamide gel autoradiography, the addition of increasing concentrations of SP2, SP9 and SP15 led to significant inhibition of 3'-end processing (Fig. 6b), yielding IC_{50} values of 13 μM , 3.1 μM and 40 μM , respectively. The IC_{50} values for inhibition of the 3'-end processing are summarized in Table 1.

There was no clear cut difference between mono- and disubstituted 3,7-dihydroxytropolones on the 3'-end processing activity. Two monosubstituted (SP47 and SP46) and one disubstituted (SP45) compounds inhibited 3'-end processing at submicromolar concentrations. However, all disubstituted 3,7-dihydroxytropolones had IC_{50} lower than 10 μM , while the IC_{50} of most monosubstituted SP compounds was greater than 10 μM (Table 1). The methylated dihydroxytropolones SP13 and SP14, and the C7-modified tropolone SP10 were completely inactive, whereas SP11 displayed a very low activity. The acetylated compound SP12 was a rather poor inhibitor ($IC_{50} = 63 \mu M$) of the 3'-processing activity, while SP20 was totally inactive.

In vitro, IN can use either Mg^{2+} or Mn^{2+} ions as cofactor, even though Mg^{2+} is most likely the cation of biological relevance. Thus, we compared the inhibition of 3'-end processing by two mono- and two disubstituted SP compounds in buffers containing 10 mM of either $MgCl_2$ or $MnCl_2$ (Table 1). In all cases, inhibition was more pronounced in the presence of Mn^{2+} , but the IC_{50} values only decreased 2 to 2.6 fold.

Strand transfer

The inhibitory effect of SP compounds on the strand transfer reaction was assayed

using a preprocessed duplex (U5B-2/U5A) as the IN substrate. The disubstituted SP9 ($IC_{50} = 1.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$) and the monosubstituted SP2 ($IC_{50} = 2.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$) and SP3 were potent inhibitors of the strand transfer reaction (Fig. 6c and Table 1). Most 3,7-dihydroxytropolones with free hydroxyl groups had IC_{50} close to $10 \mu\text{M}$. On the other hand, the C-7 modified tropolones (SP10, SP11) and the methylated 3,7-dihydroxytropolones (SP13, SP14) did not inhibit strand transfer (Table 1). The acetylated SP12 was nine fold less active than the parent compound SP15.

The IN active site adopts different conformation during the two catalytic steps of the integration process [6, 18], and it is possible to find step-specific IN inhibitors [12, 25]. Interestingly, our data show that SP1 is a rather good inhibitor of the transfer step ($IC_{50}=17 \mu\text{M}$), but a very poor inhibitor of 3'-end processing (Table 1), indicating that substituted 3,7-dihydroxytropolones can be selective inhibitors of the transfer reaction. Nevertheless, most of the SP compounds were equally efficient on both IN activities (SP5, SP7, SP8, SP9, SP10, SP12, SP13, SP14).

Cytotoxicity assays and inhibition of viral replication

The inhibitory and cytotoxicity effects of SP molecules were studied on human lymphoblastoid CEM-SS and MT-4 cells infected with HIV-1 LAI or HIV-1 IIIB strains, respectively. In the HIV-1 IIIB/MT-4 cell culture assay, SP compounds were toxic in the μM concentration range, displaying CC_{50} values from 3 to $30 \mu\text{M}$ (Table 2). In this assay, no SP compound displayed antiviral activity at concentrations below their CC_{50} ($IC_{50}>CC_{50}$). As a control, AZT was active in the low nM range, without significant cytotoxicity (Table 2).

In the HIV-1 LAI/CEM-SS cell culture system, the CC_{50} values of the SP compounds were slightly lower than on the MT4 cells and ranged from 3 to $43 \mu\text{M}$. In addition, in this cell line, SP compounds inhibited replication of HIV-1 LAI with IC_{50} ranging from 0.3 to $40 \mu\text{M}$. However, for most compounds the IC_{50} was only two- to threefold lower than the CC_{50} (Table 2). Thus, we cannot exclude that the antiviral effects we observed were indeed a direct consequence of the cytotoxicity of the SP compounds. For instance, the inhibition of HIV LAI replication by SP10 ($IC_{50}=40 \mu\text{M}$) was likely due to its toxicity (CC_{50}), since this C7-modified tropolone was inactive against all RT and IN enzymatic activities. However, it remains possible that some of the SP compounds have a real antiviral activity, especially SP15 and SP3, which have IC_{50} values 30 and 3.7 lower than their CC_{50} .

DISCUSSION

The high incidence of resistance in therapy-experienced and newly infected patients and the adverse effects of the existing treatments underscore the need for new HIV-1 inhibitors [11, 17, 32, 51]. The RT polymerase and RNase H activities as well as the IN 3'-end processing and strand transfer activities all require divalent cations and are essential for viral replication. While several inhibitors of the RT polymerase activity are in the clinic and inhibitors of the IN strand transfer activity have been tested in clinical trials [9], RNase H and 3'-end processing inhibitors are only at the earlier steps of the drug discovery pipeline.

In this study, we tested the inhibitory properties of 3,7-dihydroxytropolones on four enzymatic activities. Our choice was motivated by the observation that these compounds inhibit inositol monophosphatase by binding the two Mg^{2+} ions in the catalytic site [41, 42]. Two Mg^{2+} ions separated by 3.57 Å are present in the polymerase active site of RT in complex with a primer/template DNA duplex and an incoming nucleotide [27], and a pair of metal ion has also been observed in some crystal structures of the RNase H domain [8] and IN [4, 5, 49].

Inhibitors, including some with marked specificity, were identified for each of the four enzymatic activities tested. Interestingly, the parental compound SP15 was never the best inhibitor, indicating that the efficiency of 3,7-dihydroxytropolones can be improved by aromatic groups at positions 4 and/or 6 of the tropolone ring. 3,7-Dihydroxytropolones most efficiently inhibited the RT polymerase and the IN 3'-end processing activities: two monosubstituted compounds inhibited each of these activities at submicromolar concentrations. To our knowledge, this is the first rational attempt to inhibit HIV-1 RT by simultaneously binding the two catalytic ions. Diketo acids [47] and dihydroxypyrimidinecarboxylic acid [46] were recently shown to inhibit the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus (HCV), but whether these compounds interact with one or both metal ions in the polymerase active site is not clear.

The 4,6-disubstituted 3,7-dihydroxytropolone SP9 inhibited HIV-1 RT RNase H activity at low micromolar concentrations. This compares favorably with previously identified RNase H inhibitors such as illimaquinone ($IC_{50} = \sim 20 \mu M$) [34], N-(4-tert-

Butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone (BBNH; $IC_{50} = 3.5 \mu M$) [2], and the new RNase H-specific thiophene diketo acid (4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid) ($IC_{50} = 3.2 \mu M$) [45]. Interestingly, both BBNH and the thiophene diketo acid potentially inhibit RNase H activity by chelating one metal ion in this active site. Finally, a paper submitted at the same time as this manuscript showed that \square -Thujaplicinol, a natural monohydroxytropolone derivative, strongly inhibits HIV-1 and HIV-2 RNase H, while it is a weak inhibitor of *E. coli* and human RNase H [3]. This result further stresses the potential of hydroxytropolones as HIV inhibitors.

Several of the 3,7-dihydroxytropolones we tested were potent inhibitors of the 3'-end processing and strand transfer activities of HIV-1 IN ($IC_{50} \leq 10 \mu M$). By comparison, diketo acids inhibit IN at submicromolar concentrations [25], and styrylquinoline derivatives have IC_{50} values between 0.5 and 5 μM [12]. However, while diketo acids preferentially inhibit strand transfer, most of the tested 3,7-dihydroxytropolones equally inhibited the two IN activities, with the noticeable exception of SP1, which selectively inhibits strand transfer.

While some of the 3,7-dihydroxytropolones preferentially inhibited one of the four enzymatic activities, some had little or no specificity (e.g. SP6, SP9). It seems however unlikely that these compounds inhibit RT and IN by binding to their nucleic acid substrates. Indeed 3,7-dihydroxytropolones are negatively charged at physiological pH (~ 1.5 net negative charge at pH 7), and the uncharged *O*-methylated 3,7-dihydroxytropolones which are more likely to bind nucleic acids are completely inactive. In addition, using surface plasmon resonance, Budihas *et al.* [3] showed that natural tropolones derivatives do not bind nucleic acids. In line with these results, we found no evidence of 3,7-dihydroxytropolone binding to DNA/DNA and RNA/DNA duplexes by band-shift and fluorescence competition assays (Didierjean *et al.*, in preparation).

The data presented here suggest that 3,7-dihydroxytropolones inhibit DNA polymerase, RNase H and IN activities by chelating the Mg^{2+} ions of these active sites, even though more detailed studies will be required to prove this point. The fact that the C7-modified tropolones (SP10 and SP11) and the *O*-methylated 3,7-dihydroxytropolones (SP13 and SP14) were inactive against these four enzymatic activities suggests that the inhibitors simultaneously bind two metal ions. Acetylated dihydroxytropolones have lower affinity for Mg^{2+} than their unmodified counterparts [42]. Accordingly, acetylated compounds (SP12 and

SP20) had no or limited activity against RNase H and IN activities, and were also inactive against inositol monophosphatase [41, 42]. These compounds were fairly active against the RT polymerase activity, but SP20 was tenfold less active than the corresponding parent compound (SP15). In the RNase H site, the 4 Å distance between the metal ions [8] is not ideal for interaction with tropolones, in contrast with the polymerase active site [27]. Therefore, acetylated dihydroxytropolones might only be able to interact with the metal ions in the polymerase active site. Alternatively, only one Mg^{2+} ion might be present in the RNase H site [27], preventing binding of the weaker ligands.

Inhibition of DNA synthesis by acetylated and unmodified 3,7-dihydroxytropolones (SP 12 and SP15) was dramatically reduced at low Mg^{2+} concentration, in keeping with the chelation mechanism. We propose that binding of Mg^{2+} in the catalytic site is required to bind 3,7-dihydroxytropolones, and that these compounds compete with one or several oxygens of the catalytic amino acid side chains for Mg^{2+} chelation. Thus, 3,7-dihydroxytropolones should be more efficient at high (saturating) Mg^{2+} concentration. Crystallographic studies showed that binding of two Mg^{2+} ions in the polymerase site requires binding of the incoming dNTP [14, 27]. One ion is bound to the α and β phosphates of the dNTP and enters with it in the catalytic site; its K_d is about 0.1 mM. The second ion is bound in a subsequent step, and recent studies showed that its K_d is in the millimolar range [13]. Thus, high mM Mg^{2+} concentrations are required to saturate the polymerase active site and to reach maximal inhibition by 3,7-dihydroxytropolones.

When we compared inhibition of the IN 3'-end processing activity in $MgCl_2$ and $MnCl_2$, we observed that the SP compounds were slightly more efficient in the presence of Mn^{2+} . At first sight, one could expect strongly decreased inhibition in $MnCl_2$, as the oxygen atoms, and hence 3,7-dihydroxytropolones, have much weaker affinity for Mn^{2+} than for Mg^{2+} . However, as mentioned above, we think there is a competition between 3,7-dihydroxytropolones and the side chains of the catalytic amino acids of IN (D64, D116, and E152) for binding of the metal ions. As these amino acids and the SP inhibitors both bind the metal ions *via* oxygen atoms, their relative affinity for Mn^{2+} and Mg^{2+} should be the same, and we expected little difference in the inhibition of the SP compounds in $MgCl_2$ and $MnCl_2$. In fact, our results are consistent with those obtained with diketo acids on the IN strand transfer activity. The diketo acids that bind metal ions solely *via* oxygen atoms have similar

activity in the presence of Mg^{2+} and Mn^{2+} , while those binding metal ions *via* nitrogen atoms were at least one order of magnitude more active in $MnCl_2$ [23]. Obviously, even though our results suggest that SP compounds inhibit HIV-1 RT and IN by chelation of the metal ions in their catalytic sites, additional studies will be required to demonstrate this mechanism.

Whereas the tests on purified enzymes showed that 3,7-dihydroxytropolones have an interesting potential as HIV-1 inhibitors, cell-based assays indicated that their cytotoxicity represents a major challenge. This toxicity is most likely due to the inhibition of cellular bi-metallic enzymes. Given the number of enzymes that use metal ions for catalysis, it could be argued that it will be impossible to find 3,7-dihydroxytropolones that specifically inhibit HIV-1 enzymes. In this respect, the diketo acid derivatives constitute an interesting example. These compounds were first identified by high throughput screening for IN inhibitors [25]. Some of these compounds block HIV-1 replication by specifically inhibiting the IN strand transfer activity and exhibit low toxicity [24-26], even though they act by binding one of the metal ion in the catalytic site [23] and could potentially interfere with a number of cellular enzymes. Recently, other members of the diketo acid family have been shown to specifically inhibit HIV-1 RNase H [45] and HCV RNA polymerase [47]. These examples show that inhibitors that interfere with metal ions in the enzyme catalytic sites can be specific. In this line, 3,7-dihydroxytropolone constitutes a very interesting platform allowing a number of very different derivatives to be synthesized. In addition, modeling and structural studies of the enzyme/3,7-dihydroxytropolone complexes should allow rational design of more potent inhibitors that might also be more specific.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Chantal and Bernard Ehresmann for fruitful discussions and for their constant interest during this work, and Philippe Walter for the gift of RT.

This work was supported by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) to R.M. and from Sidaction to S.R.P. F.Q. is a pre-doctoral fellow of the ANRS.

REFERENCES

1. **Arts, E. J., and S. F. Le Grice.** 1998. Interaction of retroviral reverse transcriptase with template-primer duplexes during replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**:339-393.
2. **Borkow, G., R. S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G. I. Dmitrienko, and M. A. Parniak.** 1997. Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone. *Biochemistry* **36**:3179-3185.
3. **Budihas, S. R., I. Gorshkova, S. Gaidamakov, A. Wamiru, M. K. Bona, M. A. Parniak, R. J. Crouch, J. B. McMahon, J. A. Beutler, and S. F. Le Grice.** 2005. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res.* **33**:1249-1256.
4. **Bujacz, G., J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, M. Andrade, R. A. Katz, and A. M. Skalka.** 1997. Binding of different divalent cations to the active site of avian sarcoma virus integrase and their effects on enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **272**:18161-18168.
5. **Chen, J. C., J. Krucinski, L. J. Miercke, J. S. Finer-Moore, A. H. Tang, A. D. Leavitt, and R. M. Stroud.** 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8233-8238.
6. **Chiu, T. K., and D. R. Davies.** 2004. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* **4**:965-977.
7. **Cirino, N. M., C. E. Cameron, J. S. Smith, J. W. Rausch, M. J. Roth, S. J. Benkovic, and S. F. Le Grice.** 1995. Divalent cation modulation of the ribonuclease functions of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:9936-9943.
8. **Davies, J. F., 2nd, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, and D. A. Matthews.** 1991. Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**:88-95.
9. **De Clercq, E.** 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* **30**:115-133.
10. **De Clercq, E.** 2004. HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**:1800-1822.
11. **Demeter, L. M., H. J. Ribaud, A. Erice, S. H. Eshleman, S. M. Hammer, N. S.**

- Hellmann, and M. A. Fischl.** 2004. HIV-1 drug resistance in subjects with advanced HIV-1 infection in whom antiretroviral combination therapy is failing: a substudy of AIDS Clinical Trials Group Protocol 388. *Clin Infect Dis* **39**:552-558.
12. **Deprez, E., S. Barbe, M. Kolaski, H. Leh, F. Zouhiri, C. Auclair, J. C. Brochon, M. Le Bret, and J. F. Mouscadet.** 2004. Mechanism of HIV-1 integrase inhibition by styrylquinoline derivatives in vitro. *Mol. Pharmacol.* **65**:85-98.
13. **Deval, J., K. Alvarez, B. Selmi, M. Bermond, J. Boretto, C. Guerreiro, L. Mulard, and B. Canard.** 2005. Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using alpha-boranophosphate nucleoside analogs. *J. Biol. Chem.* **280**:3838-3846.
14. **Ding, J., K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. J. Clark, A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1998. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**:1095-1111.
15. **Ding, J., S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1997. Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* **44**:125-138.
16. **Dyda, F., A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, and D. R. Davies.** 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* **266**:1981-1986.
17. **Dykes, C., J. Najjar, R. J. Bosch, M. Wantman, M. Furtado, S. Hart, S. M. Hammer, and L. M. Demeter.** 2004. Detection of drug-resistant minority variants of HIV-1 during virologic failure of indinavir, lamivudine, and zidovudine. *J. Infect. Dis.* **189**:1091-1096.
18. **Esposito, D., and R. Craigie.** 1999. HIV integrase structure and function. *Adv. Virus Res.* **52**:319-333.
19. **Goldgur, Y., R. Craigie, G. H. Cohen, T. Fujiwara, T. Yoshinaga, T. Fujishita, H. Sugimoto, T. Endo, H. Murai, and D. R. Davies.** 1999. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **96**:13040-13043.

20. **Goldgur, Y., F. Dyda, A. B. Hickman, T. M. Jenkins, R. Craigie, and D. R. Davies.** 1998. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9150-9154.

21. **Gopalakrishnan, V., J. A. Peliska, and S. J. Benkovic.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10763-10767.

22. **Gotte, M., X. Li, and M. A. Wainberg.** 1999. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**:199-210.

23. **Grobler, J. A., K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca, and D. J. Hazuda.** 2002. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6661-6666.

24. **Hazuda, D. J., N. J. Anthony, R. P. Gomez, S. M. Jolly, J. S. Wai, L. Zhuang, T. E. Fisher, M. Embrey, J. P. J. Guare, M. S. Egbertson, J. P. Vacca, J. R. Huff, P. J. Felock, M. V. Witmer, K. A. Stillmock, R. Danovich, J. Grobler, M. D. Miller, A. S. Espeseth, L. Jin, I. W. Chen, J. H. Lin, K. Kassahun, J. D. Ellis, B. K. Wong, W. Xu, P. G. Pearson, W. A. Schleif, R. Cortese, E. Emini, V. Summa, M. K. Holloway, and S. D. Young.** 2004. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11233-11238.

25. **Hazuda, D. J., P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau, and M. D. Miller.** 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **287**:646-650.

26. **Hazuda, D. J., S. D. Young, J. P. Guare, N. J. Anthony, R. P. Gomez, J. S. Wai, J. P. Vacca, L. Handt, S. L. Motzel, H. J. Klein, G. Dornadula, R. M. Danovich, M. V. Witmer, K. A. Wilson, L. Tussey, W. A. Schleif, L. S. Gabryelski, L. Jin, M. D. Miller, D. R. Casimiro, E. A. Emini, and J. W. Shiver.** 2004. Integrase inhibitors and cellular

immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* **305**:528-532.

27. **Huang, H., R. Chopra, G. L. Verdine, and S. C. Harrison.** 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**:1669-1675.

28. **Kaushik, N., N. Rege, P. N. Yadav, S. G. Sarafianos, M. J. Modak, and V. N. Pandey.** 1996. Biochemical analysis of catalytically crucial aspartate mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **35**:11536-11546.

29. **Klumpp, K., J. Q. Hang, S. Rajendran, Y. Yang, A. Derosier, P. Wong Kai In, H. Overton, K. E. Parkes, N. Cammack, and J. A. Martin.** 2003. Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **31**:6852-6859.

30. **Leh, H., P. Brodin, J. Bischerour, E. Deprez, P. Tauc, J. C. Brochon, E. LeCam, D. Coulaud, C. Auclair, and J. F. Mouscadet.** 2000. Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* **39**:9285-9294.

31. **Lins, R. D., T. P. Straatsma, and J. M. Briggs.** 2000. Similarities in the HIV-1 and ASV integrase active sites upon metal cofactor binding. *Biopolymers* **53**:308-315.

32. **Little, S. J., S. Holte, J. P. Routy, E. S. Daar, M. Markowitz, A. C. Collier, R. A. Koup, J. W. Mellors, E. Connick, B. Conway, M. Kilby, L. Wang, J. M. Whitcomb, N. S. Hellmann, and D. D. Richman.** 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **347**:385-394.

33. **Long, Y. Q., X. H. Jiang, R. Dayam, T. Sanchez, R. Shoemaker, S. Sei, and N. Neamati.** 2004. Rational design and synthesis of novel dimeric diketoacid-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for binding to two metal ions on the active site of integrase. *J. Med. Chem.* **47**:2561-2573.

34. **Loya, S., and A. Hizi.** 1993. The interaction of illimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H activity, with the reverse transcriptases of human immunodeficiency and murine leukemia retroviruses. *J. Biol. Chem.* **268**:9323-9328.

35. **Maignan, S., J. P. Guilloteau, Q. Zhou-Liu, C. Clement-Mella, and V. Mikol.** 1998.

Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases. *J. Mol. Biol.* **282**:359-368.

36. **Marquet, R., F. Baudin, C. Gabus, J. L. Darlix, M. Mougel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1991. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **19**:2349-2357.

37. **Monier, P. L., and R. Wilcox.** 2004. Metabolic complications associated with the use of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected adults. *Am J Med Sci* **328**:48-56.

38. **Moog, C., A. Wick, P. Le Ber, A. Kirn, and A. M. Aubertin.** 1994. Bicyclic imidazo derivatives, a new class of highly selective inhibitors for the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res.* **24**:275-288.

39. **Neamati, N., Z. Lin, R. G. Karki, A. Orr, K. Cowansage, D. Strumberg, G. C. Pais, J. H. Voigt, M. C. Nicklaus, H. E. Winslow, H. Zhao, J. A. Turpin, J. Yi, A. M. Skalka, T. R. J. Burke, and Y. Pommier.** 2002. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase. *J. Med. Chem.* **45**:5661-5670.

40. **Patel, H. P., A. Jacobo-Molina, J. Ding, C. Tantillo, A. D. J. Clark, R. Raag, R. G. Nanni, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1995. Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:5351-5363.

41. **Piettre, S. R., C. Andre, M. C. Chanal, J. B. Ducep, B. Lesur, F. Piriou, P. Raboisson, J. M. Rondeau, C. Schelcher, P. Zimmermann, and A. J. Ganzhorn.** 1997. Monoaryl- and bisaryldihydroxytropolones as potent inhibitors of inositol monophosphatase. *J. Med. Chem.* **40**:4208-4221.

42. **Piettre, S. R., A. Ganzhorn, J. Hoflack, K. Islam, and J. M. Hornsperger.** 1997. Alpha-Hydroxytropolones: a new class of potent inhibitors of inositol monophosphatase and other bimetallic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **119**:3201-3204.

43. **Puech, F., G. Gosselin, I. Lefebvre, A. Pompon, A. M. Aubertin, A. Kirn, and J. L. Imbach.** 1993. Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase-mediated activation process. *Antiviral Res.* **22**:155-174.

44. **Schatz, O., F. V. Cromme, F. Gruninger-Leitch, and S. F. Le Grice.** 1989. Point mutations in conserved amino acid residues within the C-terminal domain of HIV-1 reverse transcriptase specifically repress RNase H function. *FEBS Lett.* **257**:311-314.
45. **Shaw-Reid, C. A., V. Munshi, P. Graham, A. Wolfe, M. Witmer, R. Danzeisen, D. B. Olsen, S. S. Carroll, M. Embrey, J. S. Wai, M. D. Miller, J. L. Cole, and D. J. Hazuda.** 2003. Inhibition of HIV-1 ribonuclease H by a novel diketo acid, 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid. *J. Biol. Chem.* **278**:2777-2780.
46. **Summa, V., A. Petrocchi, V. G. Matassa, M. Taliani, R. Laufer, R. De Francesco, S. Altamura, and P. Pace.** 2004. HCV NS5b RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitors: From alpha,gamma-Diketoacids to 4,5-Dihydropyrimidine- or 3-Methyl-5-hydroxypyrimidinonecarboxylic Acids. Design and Synthesis. *J. Med. Chem.* **47**:5336-5339.
47. **Summa, V., A. Petrocchi, P. Pace, V. G. Matassa, R. De Francesco, S. Altamura, L. Tomei, U. Koch, and P. Neuner.** 2004. Discovery of alpha,gamma-diketo acids as potent selective and reversible inhibitors of hepatitis C virus NS5b RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **47**:14-17.
48. **Wisniewski, M., M. Balakrishnan, C. Palaniappan, P. J. Fay, and R. A. Bambara.** 2000. Unique progressive cleavage mechanism of HIV reverse transcriptase RNase H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11978-11983.
49. **Wlodawer, A.** 1999. Crystal structures of catalytic core domains of retroviral integrases and role of divalent cations in enzymatic activity. *Adv. Virus Res.* **52**:335-350.
50. **Yang, W., and T. A. Steitz.** 1995. Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure* **3**:131-134.
51. **Yerly, S., L. Kaiser, E. Race, J. P. Bru, F. Clavel, and L. Perrin.** 1999. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* **354**:729-733.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structure of 3,7-dihydroxytropolone and schematic drawing of its interaction with two Mg^{2+} ions separated by 3.7 Å (modified from [42]).

Figure 2: Structure of the tropolones and dihydroxytropolones used in this study.

Figure 3: Inhibition of (-) strand “strong stop” DNA synthesis by SP2 and SP12. Ten nM of radiolabeled ODN/RNA1-311 complex were extended with 30 nM HIV-1 RNase H (-) RT. DNA synthesis was performed in the absence or presence of 1 μ M, 10 μ M or 100 μ M of SP 2 or SP12 for 0, 30 s, 1, 5, 10, 20, or 30 min. The (-) strand strong stop product is labeled and the pausing sites are indicated by asterisks.

Figure 4: Effect of the Mg^{2+} concentration on the inhibition of (-) strand “strong stop” DNA synthesis by SP15 and SP12. (-) Strand “strong stop” DNA synthesis was performed for 30 min. in the presence of 6 mM (closed symbols) or 0.3 mM (open symbols) Mg^{2+} , in the absence or in the presence of increasing concentrations of SP12 (circles) or SP15 (squares).

Figure 5: Inhibition of RNase H activity by 3,7-dihydroxytropolones. **a:** Experimental design and expected products of polymerase-dependent RNase H activity. In this mode of cleavage, the polymerase active site is positioned at the 3' end of the DNA primer (ODN35), and determines the position of the cleavage 17 nts downstream, yielding RNA29. RT is also able to cut 9 nts from the 3'-end of the DNA strand, producing RNA21. **b:** Inhibition of RNase H activity by SP9. The reaction was initiated by the addition of 10 nM HIV-1 RT to 10 nM of RNA1-47/ODN35 complex, in the absence or presence of 1 μ M, 10 μ M or 100 μ M of SP9. Reaction was stopped after 0, 15, 30 s, 1, 3, 5, 10, 20, or 30 min. Lane L corresponds to a RNA ladder that was used to determine the size of the products.

Figure 6: Inhibition of the 3'-end processing and strand transfer activities of HIV-1 IN by 3,7-dihydroxytropolones. **a.** Experimental design and expected products of the 3'-end processing and strand transfer reactions. The 3'-end processing removes two nts at the 3'-end of U5B, yielding U5B-2. During strand transfer, U5B-2 is randomly integrated into an homologous strand or into U5A, yielding high molecular weight products. **b.** Dose-response effect of SP2, SP9 and SP15 on the IN 3'-processing activity. The 5'-end labeled oligonucleotide U5B annealed to U5A was incubated for 1 h at 37°C with 100 nM IN. **c.**

Inhibition of the IN transfer activity by SP2, SP9, and SP15. The 5'-end labeled oligonucleotide U5B-2 annealed to U5A was incubated for 1h at 37°C with 100 nM IN. In **b** and **c**, lane “-IN” is a control without integrase, lane “EDTA” is a negative control containing 20 mM EDTA, lane “DMSO” is a control with DMSO but without SP compounds. Lanes 1 to 6 correspond to 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M and 100 μ M SP2, SP9 or SP15.

TABLES

Table 1: $\log(\text{IC}_{50})$ of the SP compounds on the polymerase and RNase H activities of HIV-1 RT, and on the 3' processing and transfer activities of HIV-1 IN. SP compounds are organized as in Figure 2.

Inhibitor	$\log(\text{IC}_{50}) \pm \text{SD}^{(1)}$			
	RT		IN	
	Polymerase	RNase H	3' Processing	Transfer
<i>Parent compound</i>				
SP15	-5.50±0.04	-4.70±0.23	-4.40±0.31	-4.98±0.05
<i>Monosubstituted</i>				
SP2	-6.18±0.07	-4.84±0.14	-4.88±0.06	-5.59±0.19
SP47	-5.63±0.10	nd	-6.15±0.11 -6.44±0.04 ⁽²⁾	nd
SP4	-5.57±0.13	-4.23±0.04	-4.88±0.08	-3.91±0.28
SP5	-5.98±0.09	-4.74±0.09	-4.96±0.05	-5.28±0.24
SP46	-6.24±0.05	nd	-6.24±0.07 -6.61±0.05 ⁽²⁾	
SP1	-4.69±0.10	-3.48±0.13	-3.69±0.10	-4.76±0.13
SP3	-5.78±0.15	-4.23±0.12	-4.54±0.27	-5.15±0.26
SP6	-4.60±0.17	-4.48±0.03	-4.27±0.04	-4.75±0.14
<i>Disubstituted</i>				
SP48	-5.50±0.18	nd	-5.64±0.06	nd
SP7	-4.29±0.22	-4.83±0.09	-5.52±0.17 -5.93±0.13 ⁽²⁾	-5.43±0.22
SP8	-3.78±0.14	-3.26±0.08	-5.06±0.08	-5.42±0.16
SP45	-4.28±0.06	nd	-6.84±0.12	nd
SP9	-5.94±0.11	-5.33±0.14	-5.51±0.08 -5.89±0.07 ⁽²⁾	-5.92±0.01

<i>C7-modified</i>				
SP10	> -3	> -3	> -3	> -3
SP11	> -3	> -3	> -3	> -3
<i>Acetylated</i>				
SP12	-5.12±0.02	-4.19±0.04	-4.04±0.18	-4.20±0.18
SP20	-4.52±0.13	-2.99±0.04	> -3	nd
<i>O-methylated</i>				
SP13	-3.72±0.13	-3.14±0.13	> -3	> -3
SP14	-3.44±0.05	> -3	-3.15±0.25	> -3

⁽¹⁾ errors are expressed either as standard deviations (SD) from a single fit, for $\log(\text{IC}_{50}) > -5$, or as SD from at least three measurements, for $\log(\text{IC}_{50}) < -5$. All data were obtained in MgCl_2 , except those indicated by ⁽²⁾, which were obtained in 10 mM MnCl_2 . nd: not determined.

Table 2: Inhibition of HIV-1 replication (IC_{50}) and cytotoxicity (CC_{50}) of selected SP compounds on CEM SS and MT4 cell lines.

Inhibitor	HIV-1 LAI/CEM SS		HIV-1 IIB/MT4	
	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
SP1	39	64	> CC_{50}	30
SP2	3	7	> CC_{50}	3
SP3	3	11	> CC_{50}	3
SP4	5	9	> CC_{50}	5
SP5	10	20	> CC_{50}	8
SP7	6	7.5	> CC_{50}	43
SP9	3	6	> CC_{50}	5
SP10	40	48	> CC_{50}	29
SP12	5	7	> CC_{50}	6
SP15	0.3	9	> CC_{50}	3
AZT	0.004	-	0.01	-

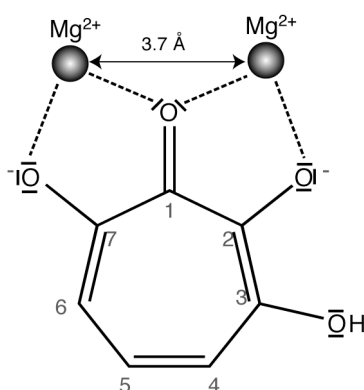


Figure 1

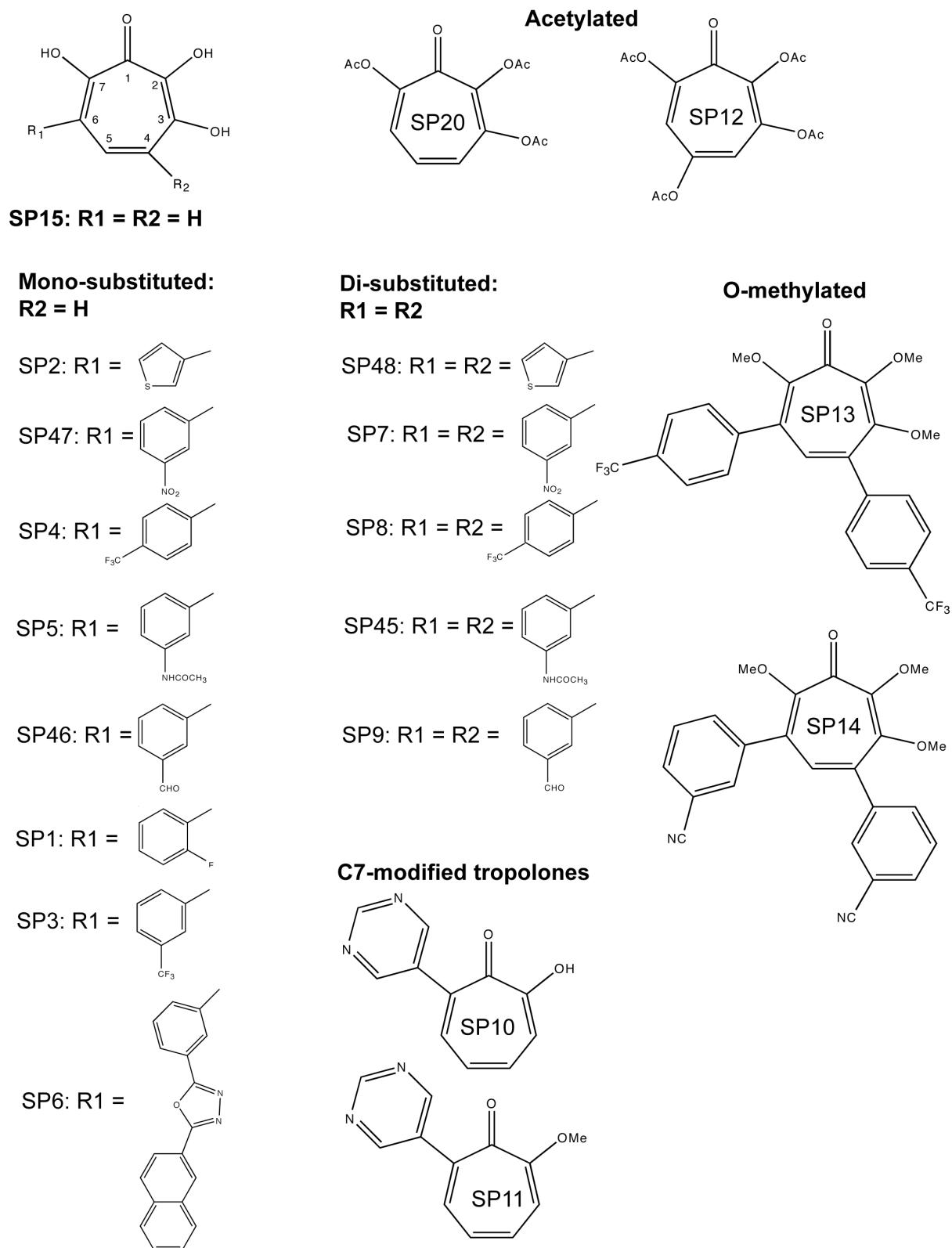


Figure 2

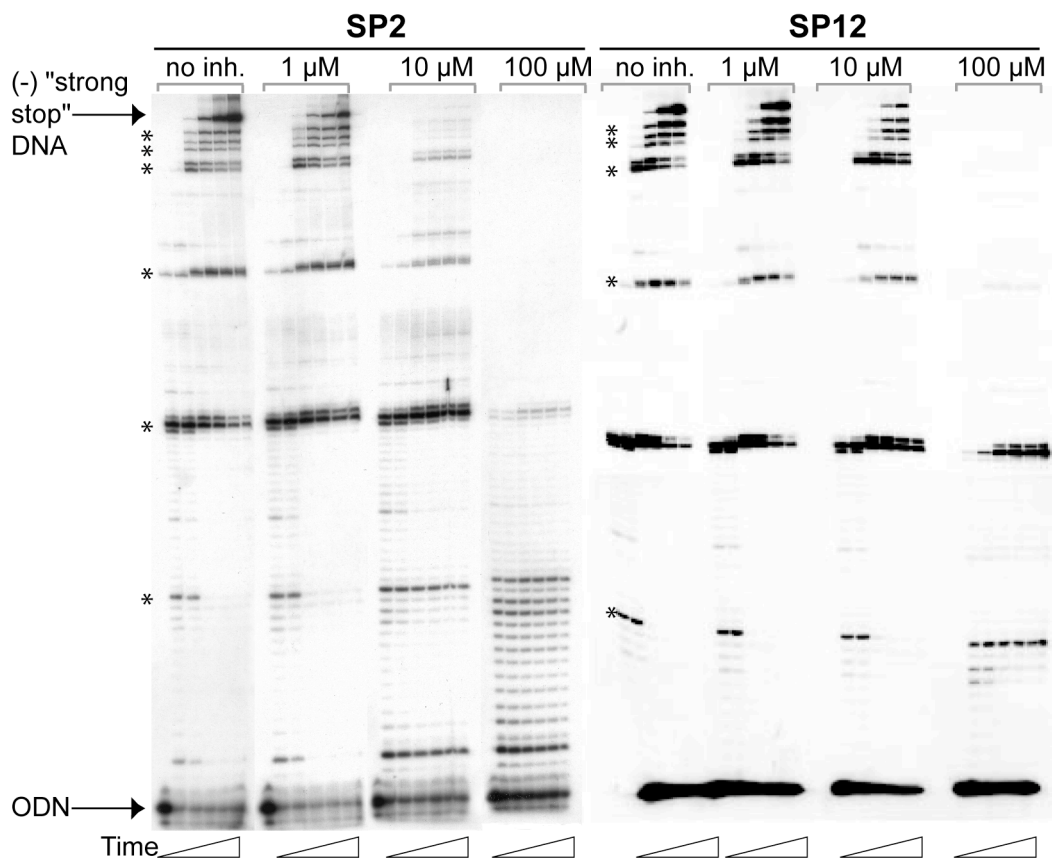


Figure 3

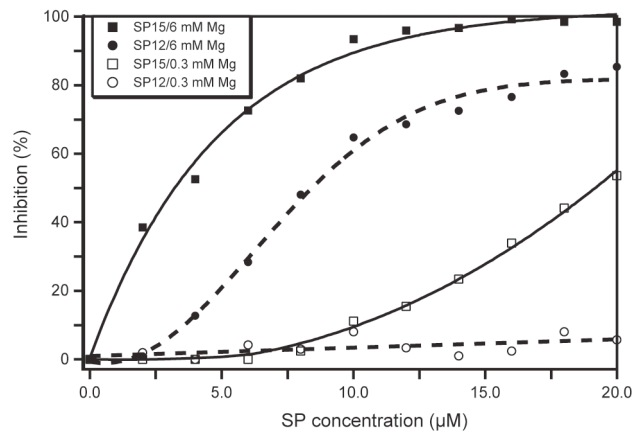


Figure 4

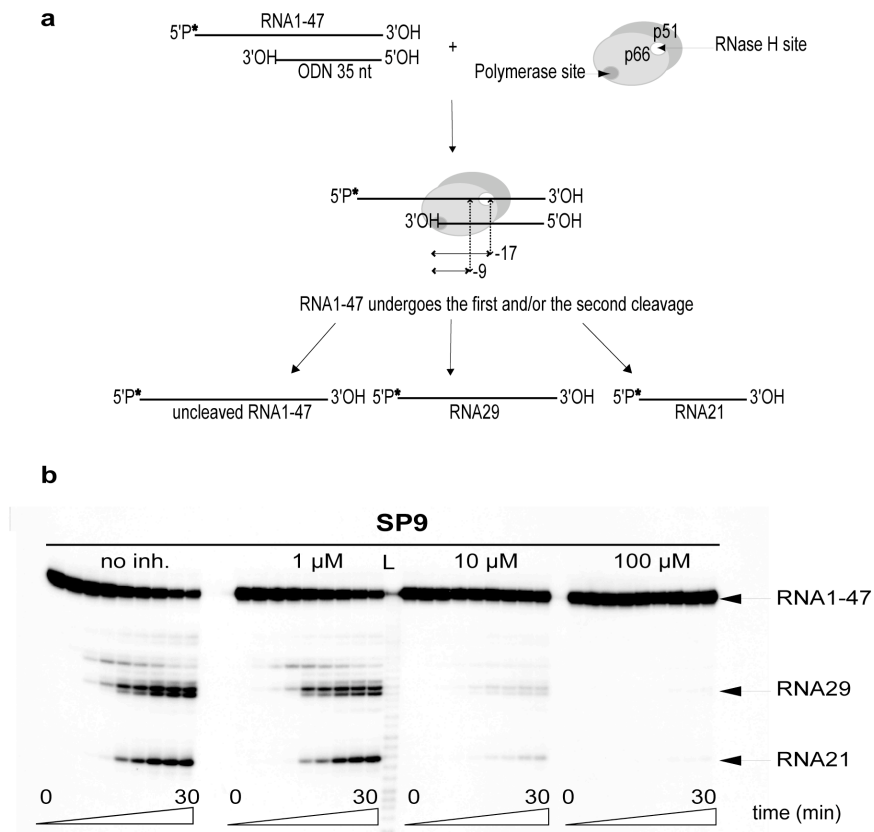


Figure 5

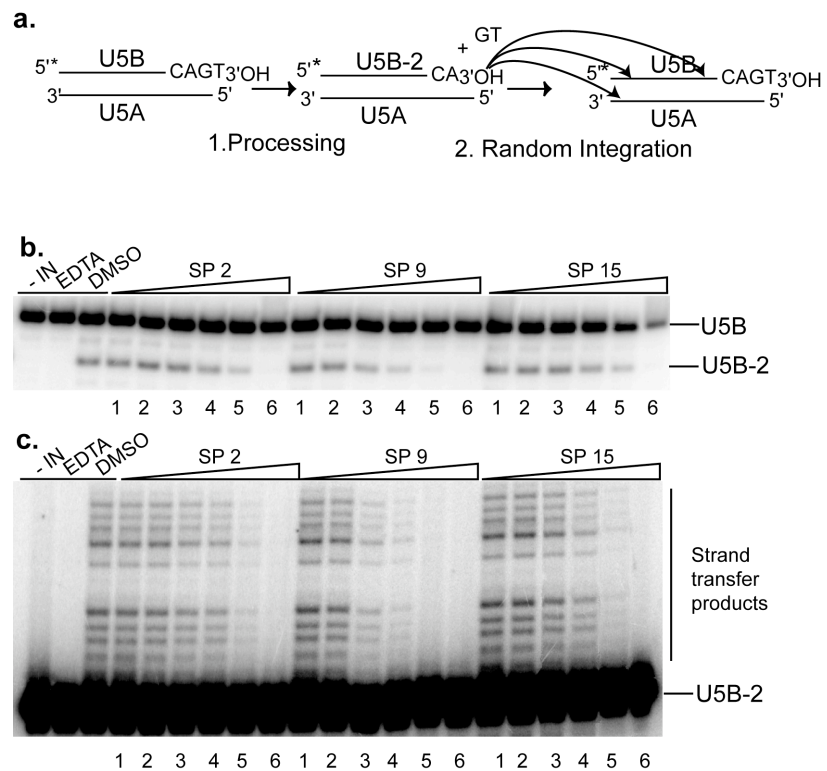


Figure 6

II. Résultats – Conclusions

Lors de ces études, nous avons montré, en suivant la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-), qui correspond à une extension de 178 nts d'une amorce complémentaire à la région PBS de l'ARNv de l'isolat MAL (Figure 26), que l'activité polymérase est inhibée à 50% (IC_{50}) en présence de concentrations sous-micromolaires des composés SP2 et SP46 ($IC_{50}(SP2) = 0,66 \mu M$ et $IC_{50}(SP46) = 0,58 \mu M$) (Tableau 5). L'inhibition observée est séquence indépendante et de fortes concentrations en inhibiteur induisent un schéma de polymérisation de type distributif (Figure 3 de la publication). En outre, les 3,7-DHT les plus efficaces inhibent l'activité RNase H polymérase-dépendante (Figure 23) à des concentrations micromolaires ($IC_{50}(SP9) = 4,7 \mu M$, $IC_{50}(SP19) = 4,2 \mu M$ et $IC_{50}(SP28) = 3,2 \mu M$) (Tableau 5). Enfin, les meilleures IC_{50} de l'inhibition des activités de processing et de transfert de l'IN du VIH-1 par les 3,7-DHT sont respectivement sous-micromolaires ($IC_{50}(SP45) = 0,14 \mu M$, $IC_{50}(SP46) = 0,58 \mu M$ et $IC_{50}(SP47) = 0,71 \mu M$) et micromolaires ($IC_{50}(SP9) = 1,2 \mu M$ et $IC_{50}(SP2) = 2,6 \mu M$), certains composés n'ayant pas été testés sur les deux activités de l'IN (Figure 6 de la publication). Le tableau 5 répertorie les résultats des expériences de détermination des IC_{50} de l'ensemble des composés SP.

Le composé SP9 est un très bon inhibiteur non sélectif, des quatre activités testées ($IC_{50}(SP9) < 5 \mu M$), contrairement aux composés acétylés qui sont spécifiques de l'activité polymérase (Tableau 5). Néanmoins, aucun composé testé ne montre de spécificité envers l'activité RNase H.

Une faible sélectivité est observée avec SP16 d'une part ainsi que SP6 et SP8 d'autre part, respectivement pour l'activité de processing et de transfert de brin de l'IN (Tableau 5). Il semble également possible d'obtenir des composés spécifiques de la réaction de processing ou de transfert, au sein même de l'IN. En effet, le composé SP4 est un bon inhibiteur de l'activité de processing ($IC_{50}(SP4) = 13 \mu M$) mais pas de l'activité de transfert ($IC_{50}(SP4) > 100 \mu M$) tandis que le composé SP1 est plutôt un bon inhibiteur de la réaction de transfert ($IC_{50}(SP1) = 10 \mu M$) mais n'inhibe pas la réaction de processing à $100 \mu M$ (Tableau 5). Les différentes conformations adoptées par le site actif de l'IN lors des deux étapes du processus d'intégration pourraient expliquer les différences d' IC_{50} observées pour un même inhibiteur (55, 105).

Résultats et Discussion

	Activité in vitro (μM)				Toxicité en culture cellulaire (μM)			
	RT		IN		VIH-1 LAI / CEM SS		VIH-1 IIIIB / MT 4	
	Pol	RNase H	Processing	Transfert	IC50	CC50	IC50	CC50
SP1	20	> 100	> 100	17	39	64	> CC50	30
SP2	0,66	14	13	2,6	3	7	> CC50	3
SP3	1,7	59	29	7,1	3	11	> CC50	3
SP4	2,7	59	13	> 100	5	9	> CC5	5
SP5	1,2	18	11	5,3	10	20	> CC50	8
SP6	25	33	54	18	ND	ND	ND	ND
SP7	51	15	3	3,7	6	7,5	> CC50	43
SP8	> 100	> 100	8,7	3,8	ND	ND	ND	ND
SP9	1,2	4,7	3,1	1,2	3	6	> CC50	5
SP10	> 100	> 100	> 100	> 100	40	48	> CC50	29
SP11	> 100	> 100	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND
SP12	7,6	65	91	91	5	7	> CC50	6
SP13	> 100	> 100	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND
SP14	> 100	> 100	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND
SP15	3,2	20	40	11	0,3	9	> CC50	3
SP16	> 100	> 100	10	100	> 100	> 100	> 100	> 100
SP17	10	86	> 100	ND	0,5	1	> CC50	0,4
SP18	10	8,3	57	ND	1,5	7	> CC50	1,2
SP19	6,4	4,2	53	ND	1,5	1,8	> CC50	3
SP20	26	> 100	> 100	ND	0,3	1	> CC50	0,2
SP21	9,1	> 100	ND	ND	0,2	0,9	> CC50	0,2
SP22	17	> 100	ND	ND	0,5	2	> CC50	0,5
SP23	10	> 100	ND	ND	0,9	1,8	> CC50	0,5
SP24	14	34	ND	ND	0,4	0,6	> CC50	0,4
SP25	3,5	17	ND	ND	5	10	> CC50	3
SP28	5,8	3,2	64	ND	2	4	> CC50	3
SP29	6,5	> 100	> 100	ND	0,5	1,8	> CC50	0,4
SP30	5,4	> 100	> 100	ND	0,3	1,3	> CC50	0,4
SP32	2	14	2	ND	3	4	> CC50	2
SP35	3,8	> 100	> 100	ND	0,3	0,6	> CC50	0,3
SP45	52	ND	0,14	ND	ND	ND	ND	ND
SP46	0,58	ND	0,58	ND	ND	ND	ND	ND
SP47	2,3	ND	0,71	ND	ND	ND	ND	ND
SP48	3,2	ND	2,3	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 5 Valeurs des IC_{50} d'inhibition de la RT et de l'IN et de toxicité cellulaire.

Toutes les valeurs sont en μM . IC_{50} = concentration en inhibiteur pour laquelle on observe 50% d'inhibition, CC_{50} = concentration en inhibiteur induisant la mort de 50% des cellules. Les cellules grisées correspondent aux valeurs non déterminées (ND), les cellules couleur saumon aux plus fortes activités inhibitrices.

Les tropolones modifiées en C7, SP10 et SP11, et les 3,7 DHT O-méthylées SP13 et SP14 sont totalement inactives à l'encontre des quatre activités, ce qui suggère que les inhibiteurs lient simultanément les deux ions métalliques. Enfin, le composé parent SP15 n'est jamais le meilleur inhibiteur, ce qui indique que l'efficacité des 3,7 DHT peut être augmentée par des groupes aromatiques en position 4 et/ou 6 ou 5 sur le noyau tropolone (Tableau 5).

Nous avons également montré que l'inhibition de l'activité polymérase par les 3,7 DHT est très sensible à la concentration en magnésium. À 6 mM de Mg^{2+} , les IC_{50} de SP15 et de SP12 sont respectivement de 3,2 et 7,6 μM , tandis qu'à 0,3 mM de Mg^{2+} , l' IC_{50} de SP15 atteint 19 μM et l'inhibition de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-) devient quasi-indétectable pour SP12 (Figure 4 publication). Ce résultat suggère que les 3,7 DHT ne lient le site actif polymérase qu'en présence des ions Mg^{2+} , en accord avec un mécanisme d'action impliquant la chélation des cations catalytiques.

En outre, les composés acétylés sont très peu efficaces, à la fois sur l'activité RNase H et sur les activités de processing et de transfert de l'IN, ce qui peut s'expliquer par les similitudes structurales des sites catalytiques qui sont le siège de ces activités. En effet, les IC_{50} des composés O-acétylés SP17, SP20, SP21, SP22, SP23, SP29, SP30 et SP35 sont proches ou supérieures à 100 μM pour ces trois activités (Tableau 5). À l'inverse, les IC_{50} s de ces composés sur l'activité polymérase sont toutes inférieures à 20 μM . Ainsi, il semble bien que l'acétylation des hydroxyles O2 et O7 (Figure 42) ne soit avantageuse que pour la mise au point de molécules dirigées contre l'activité polymérase de la RT, ce qui offre la possibilité de réduire le nombre d'enzymes cellulaires cibles de ces molécules, dont l'inositol monophosphatase (264). Cependant, cet élément seul n'est pas suffisant pour réduire la toxicité des 3,7-DHT acétylées (cf. tableaux 4 et 5).

En contradiction avec l'hypothèse du Pr S.Piettre (cf. Objectifs du travail de thèse), les composés acétylés dont SP12, inhibent l'activité polymérase. Il semble probable que la présence des acétates aux positions O2 et O7 n'empêche pas la chélation des ions Mg^{2+} , dans le site actif polymérase.

L'étude de composés mono/disubstitués révèle que les composés monosubstitués en C6 (SP2, SP5, SP47 et SP46) sont de meilleurs inhibiteurs de l'activité polymérase que leurs homologues disubstitués en position C4 et C6, respectivement SP48, SP45, SP7 et SP9. L'encombrement et la nature du substituant greffé en position C6 permettent d'expliquer cet effet. La comparaison des couples SP2/SP48 et SP5/SP45 montre que l'IC₅₀ augmente respectivement d'un facteur 5 et 43 lors de l'ajout d'un groupement supplémentaire, d'encombrement différent, aux composés SP2 et SP5 (Tableaux 4 et 5). De plus, des substituants de même encombrement, mais de nature différente, ont un effet variable sur l'augmentation de l'IC₅₀ de l'activité polymérase. L'addition d'un groupement 3-benzaldéhyde à SP46 et 3-nitrophényl à SP47 induit une augmentation respective de l'IC₅₀ de 2 et 22 fois (Tableaux 4 et 5).

Bien que les études d'inhibition de la RT et de l'IN purifiées montrent un potentiel anti-VIH intéressant, les tests en culture cellulaires, sur les systèmes souche LAI du VIH-1/cellules CEM SS et souche IIIB du VIH-1/cellules MT4, indiquent que la cytotoxicité des composés SP représente un obstacle majeur (Tableau 5). Néanmoins, cette toxicité, de l'ordre du micromolaire et probablement liée à l'inhibition de nombreuses enzymes bimétalliques cellulaires, n'est pas insurmontable. En effet, certains dikéto-acides liant un ion métallique dans le site catalytique de l'IN (130), et donc potentiellement inhibiteur de nombreuses autres enzymes cellulaires, ont été identifiés par un criblage à haut flux et présentent une faible toxicité (139, 140). En outre, le noyau cycloheptatriènone des 3,7-DHT offre de nombreuses possibilités de substitutions ou d'addition de groupements chimiques permettant d'augmenter la sélectivité et de diminuer la toxicité de ces inhibiteurs.

Chapitre II : Mécanisme d'inhibition de l'activité polymérase par les 3,7-dihydroxytropolones

I. Stratégie expérimentale

Comme mentionné précédemment (cf. Introduction. I. 2. B. 3. b), la RT est une ADN polymérase répondant à un mécanisme de type bi-bi ordonné (272) (Figure 24), dans lequel la fixation des substrats (le complexe A/M puis le dNTP) et la libération des produits (le PPI puis le complexe amorce étendue/matrice) se produisent dans un ordre précis.

Afin de déterminer le mode d'inhibition des 3,7-DHT sur l'activité ADN polymérase ARN-dépendante, vis-à-vis des dNTPs, nous nous sommes placés dans des conditions michaeliennes où la concentration en substrat est largement supérieure à celle de l'enzyme. En outre, nous nous sommes assurés que les conditions expérimentales permettent de rester en vitesse initiale de polymérisation.

Dans l'objectif de simplifier le système enzymatique, rendu complexe par l'existence de deux substrats et par la possibilité pour la RT d'incorporer plusieurs nucléotides sans se dissocier du complexe A/M, nous avons voulu savoir si les 3,7-DHT inhibent la polymérisation en se fixant à la RT libre ou au complexe (A/M):RT. Pour cela, nous avons préincubé la RT^{EQ}, contenant la mutation E498Q qui inactive l'activité RNase H de la RT, avec un complexe (oligo(dT)₁₈/poly(rA)). Nous avons ensuite réalisé des cinétiques d'incorporation de dTTP[³H] en présence d'héparine, qui piège la RT se dissociant du complexe (oligo(dT)₁₈/poly(rA)), et de concentrations variables en inhibiteur SP15 (2,5 et 10 μM) (Figure 43). Les représentations «Nombre de cpm = f(temps)» sont ajustées, à l'aide du logiciel Igor Pro, selon l'exponentielle «Nombre de cpm = C_{max} · (1 - e^(-k_{off} * temps))», où C_{max} = k_{cat}/k_{off}.

Les résultats (Figure 43) montrent que l'amplitude et les plateaux C_{\max} des courbes obtenues (86000, 67000, 45000 cpm, respectivement pour 0, 2,5 et 5 μM de SP15) diminuent lorsque la concentration en inhibiteur augmente. Ainsi, SP15 inhibe au moins partiellement la réaction en se fixant au complexe $\text{RT}^{\text{EQ}}:(\text{oligo}(\text{dT})_{18}/\text{poly}(\text{rA}))$.

Nos résultats montrent également que le k_{off} (0.051 ± 0.020 , 0.058 ± 0.021 , $0.052 \pm 0.027 \text{ min}^{-1}$ respectivement pour 0, 2,5 et 5 μM de SP15) reste constant lorsque la concentration de SP15 augmente, ce qui signifie que le temps de vie moyen ($1/k_{\text{off}}$) du complexe $\text{RT}^{\text{EQ}}:(\text{oligo}(\text{dT})_{18}/\text{poly}(\text{rA}))$ est constant quelle que soit la concentration en inhibiteur, de l'ordre de 19 min. Ce résultat est compatible avec un temps moyen de dissociation du complexe ternaire $\text{RT}:(\text{ODN}/\text{ARN}_{1-311})$ d'environ 17 min (194) déterminé préalablement. Par conséquent, lors de cinétiques sur des temps courts, l'étude de l'activité polymérase peut être réduite à un système simple dans lequel le seul substrat est le dTTP tandis que le complexe ternaire $\text{RT}:(\text{A}/\text{M})$ est considéré comme l'enzyme [E]. Il est à noter que la fixation des 3,7-DHT à la RT libre reste envisageable mais ne peut être visualisée dans cet essai. Les schémas réactionnels pour une réaction à un seul substrat ainsi que les schémas d'inhibition sont récapitulés dans les figures 44 et 48.

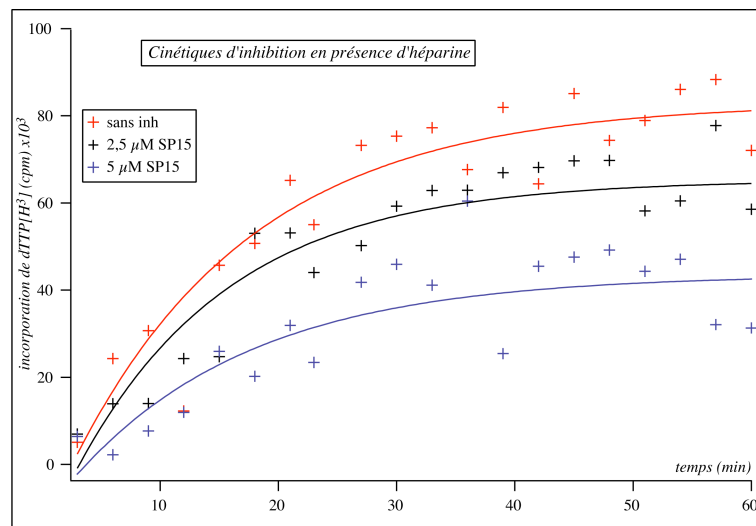


Figure 43 : Cinétiques d'inhibition en présence d'héparine.

Le substrat $\text{oligo}(\text{dT})_{18}/\text{poly}(\text{rA})$ est formé par incubation de l'amorce $(\text{dT})_{18}$ avec un excès de 10 fois en masse d'une matrice $\text{poly}(\text{rA})$, 20 min à 70°C dans 100 mM NaCl. Le complexe $\text{oligo}(\text{dT})_{18}/\text{poly}(\text{rA})$ (500 nM) est préincubé avec 50 nM de RT^{EQ} pendant 4 min, puis de l'héparine est ajoutée à une concentration finale de $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Après 2 minutes d'incubation, la réaction de polymérisation est initiée par l'addition de 5 μM de dTTP [H^3], en présence de 0, 2,5, ou 5 μM d'inhibiteur SP15. Des prélèvements sont effectués toutes les 3 minutes et sont déposés sur un filtre en fibre de verre (Millipore). Les acides nucléiques précipitent en présence de TCA froid 5%. Après lavages au TCA, à l'éthanol et séchage, les filtres sont recouverts de liquide de scintillation afin de déterminer radioactivité incorporée dans la chaîne d'ADN lors de la réaction.

Fixation	Schéma réactionnel	Variation de V_m et K_M	Michaelis et Menten	Lineweaver et Burk
Compétitif S et I sont mutuellement exclusifs. Il y a compétition pour un même site.	$E + S \xrightleftharpoons{K_S} ES \xrightarrow{k_p} E + P$ $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$	V_m constante $K_{Mapp} = K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$		
Non compétitif* I n'a pas d'effet sur la fixation de S et vice-versa. S et I se lient indépendamment à leur site. Le complexe ESI est catalytiquement inactif.	$E + S \xrightleftharpoons{K_S} ES \xrightarrow{k_p} E + P$ $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$ $E + S + I \xrightleftharpoons{K_S K_i} ESI$	K_M constant $V_{mapp} = V_m / (1 + [I]/K_i)$		
Mixte linéaire* La fixation de I modifie l'affinité de E pour S d'un facteur α . De même S modifie l'affinité de E pour I par le même facteur.	$E + S \xrightleftharpoons{K_S} ES \xrightarrow{k_p} E + P$ $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$ $E + S + I \xrightleftharpoons{\alpha K_S K_i} ESI$	$V_{mapp} = \frac{V_m}{(1 + [I]/(\alpha K_i))}$ $K_{Sapp} = K_S \cdot (1 + [I]/K_i) / (1 + [I]/(\alpha K_i))$ (Système où $\alpha > 1, \beta = 0$)		
Incompétitif I ne se lie pas à E libre. I se lie réversiblement à ES. Le complexe ESI est inactif.	$E + S \xrightleftharpoons{K_S} ES \xrightarrow{k_p} E + P$ $ES + I \xrightleftharpoons{K_i} ESI$	$V_{mapp} = V_m / (1 + [I]/K_i)$ $K_{Mapp} = K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$		

Figure 44 Les quatre types d'inhibition réversibles.

* Des cas particuliers de ces inhibitions sont illustrés par la figure 48 (partie B et C)

II. Détermination des paramètres enzymatiques de l'inhibition

1. Généralités

Il existe quatre types d'inhibition réversible (Figure 44), qui se distinguent par leur effet sur la vitesse initiale maximale de la réaction (V_{\max}) et sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_m). L'inhibition *compétitive* modifie le K_m et non la V_{\max} , l'inhibition *non compétitive* modifie la V_{\max} mais pas le K_m . Enfin, les inhibitions *mixte* et *incompétitive*, affectent à la fois la V_{\max} et le K_m . La représentation graphique la plus couramment utilisée pour accéder au mode d'inhibition est la représentation de Lineweaver-Burk « $1/V_o = f(1/[\text{Substrat}])$ » et nécessite la détermination des vitesses initiales maximales de polymérisation (V_o , cpm/s) pour chaque concentration en dTTP et en inhibiteur (voir la méthodologie en (*)).

2. Variation de la vitesse initiale en présence de SP15

En présence d'une concentration donnée en dTTP et à différentes concentrations en inhibiteur, les valeurs de V_o sont obtenues par le calcul de la pente des droites de la représentation « $\text{cpm} = f(\text{temps})$ » (Figure 45). Le report de ces valeurs dans la représentation de Lineweaver-Burk permet d'obtenir des droites pour chaque concentration en inhibiteur (Figure 46). Celles-ci sont ajustées selon les équations correspondant à chaque mode d'inhibition grâce au logiciel Igor Pro, qui fournit les valeurs des V_{\max} , K_m , K_i (constante d'inhibition) et α (facteur modifiant l'affinité du substrat pour l'enzyme en présence de l'inhibiteur et vice-versa dans le cas d'un inhibiteur mixte) ainsi que le coefficient global d'écart χ^2 .

L'expérience a été réalisée avec cinq concentrations en dTTP et cinq concentrations en inhibiteur SP15. Les résultats montrent (Figure 46) que les pentes des droites obtenues dans la représentation de Lineweaver-Burk augmentent significativement lorsque la concentration en inhibiteur augmente. Ce résultat permet d'éliminer une inhibition de type incompétitive, qui se traduirait par des droites parallèles (donc des pentes constantes) dans la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 44). Il nous indique que la fixation du dTTP n'est pas requise pour permettre la fixation de l'inhibiteur au complexe RT/(A/M). Néanmoins, les 3 autres types d'inhibition, sont ajustables avec des écarts comparables (valeurs des χ^2 quasi-identiques) (Figure 46) et s'accordent sur un K_i de $5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ pour SP15, dans le système expérimental utilisé. Ces données ne permettent donc pas de discriminer entre les trois modes d'inhibition restants.

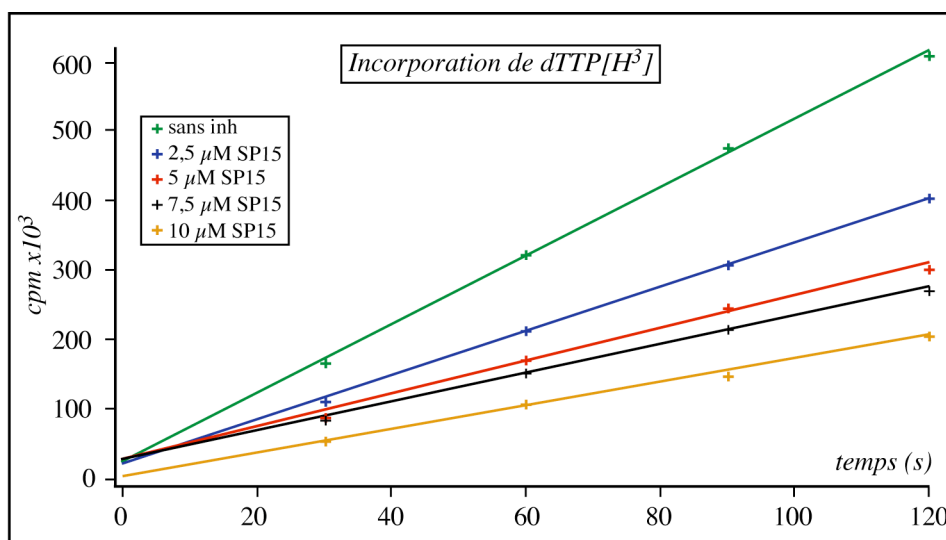


Figure 45 : Inhibition de la réaction de polymérisation par SP15, en présence de 10 μM de $d\text{TTP}[\text{H}^3]$.

Les pentes des différentes droites représentent la vitesse initiale de polymérisation (cpm/s) dans les conditions michaeliennes, pour les différentes concentrations d'inhibiteur SP15. Celles-ci ainsi que les pentes obtenues, pour les autres concentrations en $d\text{TTP}[\text{H}^3]$ (2, 2,5, 3,33 et 5 μM), sont reportées dans la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 46).

(* *Méthodologie générale, applicable à l'ensemble des réactions réalisées sur un complexe A/M de type oligo(dT)₁₈/poly(rA) (sauf mention contraire)* □)

Le substrat oligo(dT)₁₈/poly(rA) est formé par incubation de l'amorce (dT)₁₈ avec un excès de 10 fois en masse d'une matrice poly(rA), 20 min à 70°C dans 100 mM NaCl. Le substrat (500nM) est incubé 4 minutes avec la RT^{EQ} (25nM) à 37°C, puis la réaction est initiée par l'addition de $d\text{TTP}[\text{H}^3]$ (10 μM final dans la figure 45), en absence ou en présence de 2,5, 5, 7,5 et 10 μM final d'inhibiteur. La réaction se déroule à 37°C, dans 50 mM Tris-HCl pH8,3 (37°C), 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂ et 1mM DTE. Des prélèvements sont effectués à 0, 30, 60, 90 et 120 s. La réaction est arrêtée par précipitation des acides nucléiques sur un filtre en fibre de verre (plaque Multiscreen™-FC MAFCN0B10 Millipore) contenant du TCA froid 5%. Après une incubation de la plaque à 4°C pendant 30 minutes, permettant une précipitation homogène, les filtres sont lavés au TCA puis à l'éthanol et séchés. La radioactivité contenue dans chaque puits est ensuite comptée en présence de liquide de scintillation.

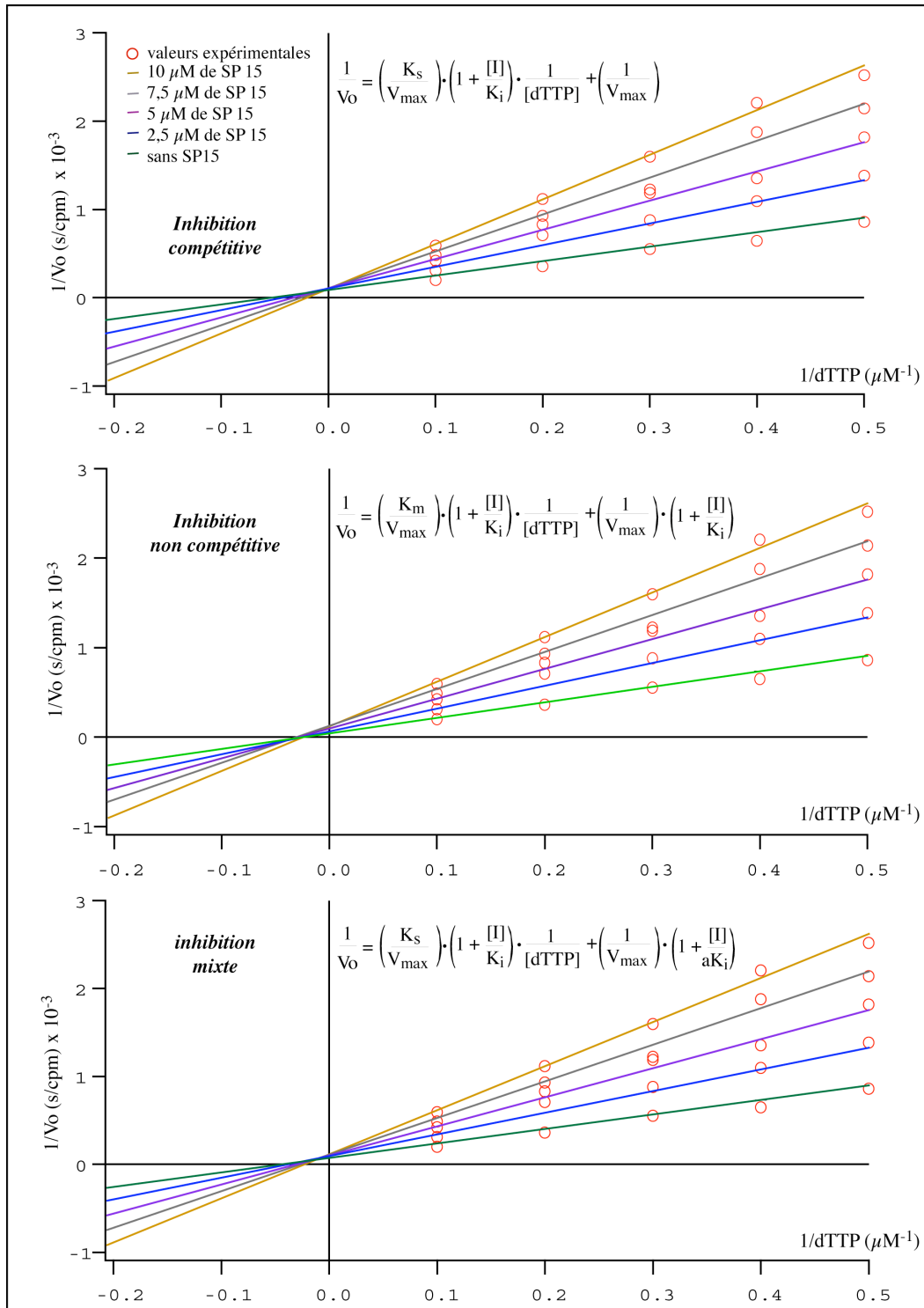


Figure 46 : Représentations de Lineweaver-Burk des différents modes d'inhibition envisageables.

Les trois graphiques représentent les ajustements globaux des valeurs expérimentales (pentes des droites obtenues dans les représentations $\text{cpm} = f(\text{temps})$, figure 45) avec les équations correspondant aux trois modes d'inhibition envisageables. Les résultats montrent que les valeurs des écarts globaux X^2 ($1.101 \cdot 10^{-7}$, $1.104 \cdot 10^{-7}$ et $1.091 \cdot 10^{-7}$ respectivement pour une inhibition compétitive, non compétitive et mixte) sont très proches quel que soit le type d'inhibition. Il n'est par conséquent pas possible de conclure à un type d'inhibition particulier.

3. Variation de la vitesse initiale maximale V_{max} en présence de SP15

L'étude de la variation de la V_{max} en présence de la 3,7-DHT SP15 est un moyen simple de discriminer entre une inhibition de type compétitive, où la V_{max} n'est pas affectée, et les trois autres types d'inhibitions où elle est variable. Dans cette optique, nous avons mesuré V_0 dans des conditions michaeliennes, sur un large intervalle de concentration en dTTP (1 à 60 μM). Les valeurs obtenues ont été reportées dans la représentation de Michaelis-Menten, $\ll V_0 = f([dTTP])$ (Figure 47), et les courbes ajustées selon l'équation $V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$ (Figure 48). Nos résultats montrent clairement une diminution de la valeur de la V_{max} lorsque la concentration en inhibiteur augmente (25000 \pm 1000, 16000 \pm 2000 et 11000 \pm 1000 cpm/s respectivement pour 0, 5 et 10 μM de SP15) ce qui permet d'éliminer sans ambiguïté une inhibition de type compétitive.

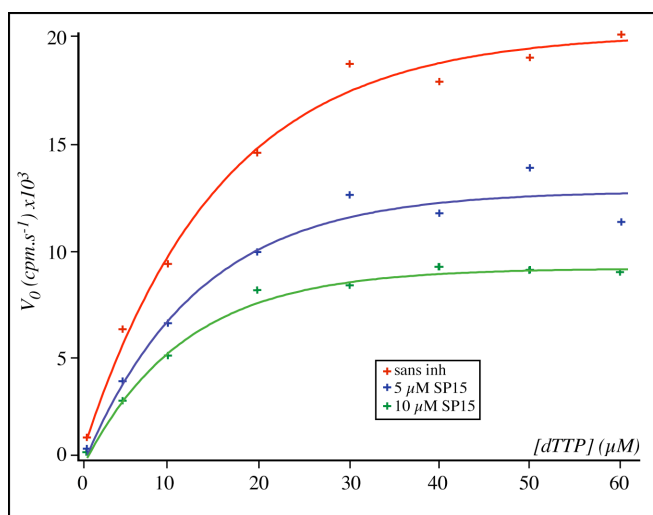


Figure 47 : Représentation de Michaelis-Menten de l'inhibition de la polymérase par SP15.

Cinétiques d'inhibition de l'activité polymérase par le composé SP15 (0, 5 et 10 μM) en présence de 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 μM de dTTP[H 3]. Les valeurs expérimentales sont ajustées selon l'équation de Michaelis-Menten (Figure 48). (Mode opératoire, cf. légende figure 45).

Un ajustement global de l'ensemble de ces courbes est réalisé à l'aide des équations correspondant aux inhibitions mixtes linéaires et hyperboliques ainsi qu'aux inhibitions non compétitives pures et partielles (Figure 48.B et C). Les résultats montrent que les inhibitions mixte hyperbolique et non compétitive partielle sont incompatibles avec nos données expérimentales, en raison de l'obtention de valeurs négatives pour certains paramètres. Dans le cas d'une inhibition mixte linéaire ou non compétitive pure, le facteur α (Figure 48.C) est proche de 0, indiquant que le complexe ESI est quasi-inactif.

Les valeurs d'écart global des ajustements correspondant à ces inhibitions sont très proches (environ $1,4 \cdot 10^7$) et il apparaît difficile de privilégier un mode d'inhibition par rapport à un autre sur la base de ces données. Dans le cas d'une inhibition mixte (Figure 44), la fixation de l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme pour le substrat d'un facteur α ($K_m \text{ apparent} = \alpha K_m$). Ce facteur est égal à 1 dans le cas d'une inhibition non compétitive, cas extrême de l'inhibition mixte. La représentation de Michaelis-Menten (Figure 47) montre que la valeur du K_m n'est pas significativement différente en présence d'inhibiteur (15 ± 3 , 13 ± 4 et $11 \pm 2 \mu\text{M}$ respectivement en présence de 0, 5 et 10 μM de SP15). Il apparaît donc qu'aux erreurs de mesure près, SP15 agit comme un inhibiteur non compétitif pur. Le type d'inhibition non compétitif a également été confirmé pour la 3,7-DHT acétylée SP12 ($K_i = 6,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$), et pour les 3,7 DHT SP2 ($K_i = 8,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$) et SP5 ($K_i = 9 \pm 2 \mu\text{M}$).

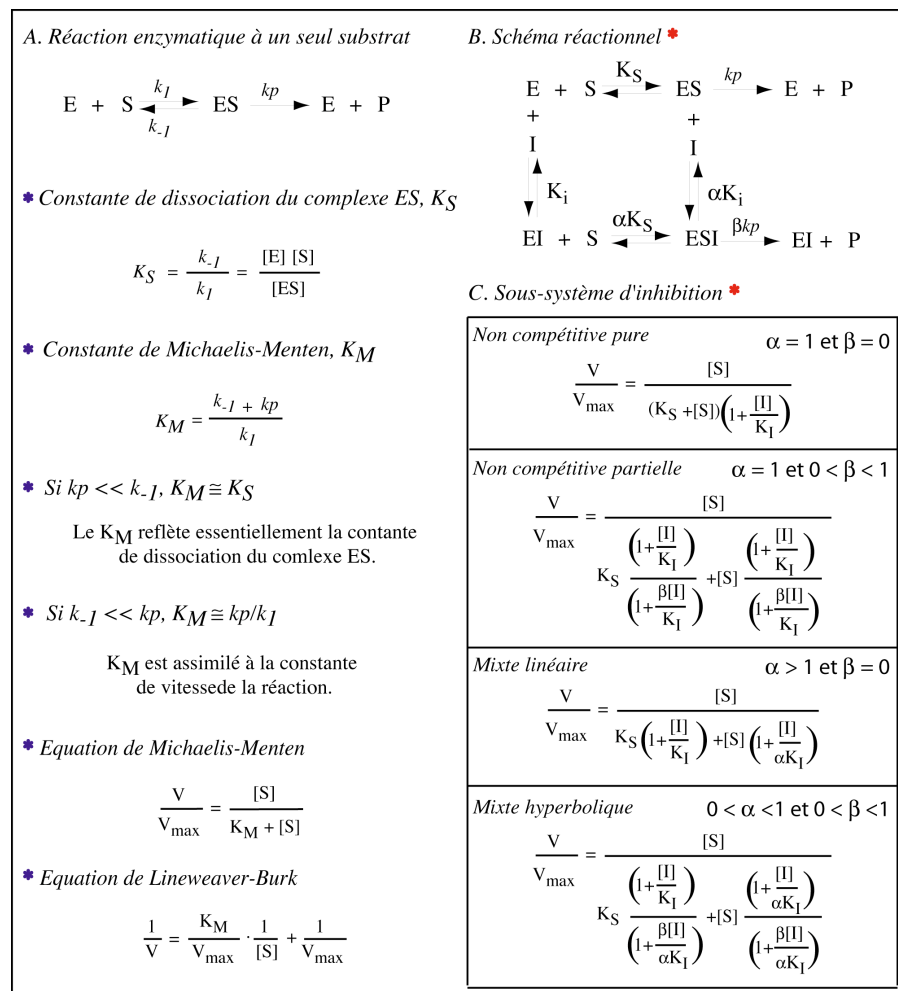


Figure 48 : Généralités sur les cinétiques enzymatiques et systèmes d'inhibition particuliers.

A. Généralité d'enzymologie. **B.** Schéma réactionnel général en présence d'un inhibiteur. **C.** Equations de vitesse des sous-systèmes non compétitifs pur et partiel ainsi que mixte linéaire et hyperbolique. * Se référer à la figure 44.

4. Réversibilité de l'inhibition par les 3,7-dihydroxytropolones

L'effet net d'une inhibition non compétitive réversible se traduit par une diminution apparente de la quantité d'enzyme totale, disponible pour la réaction de polymérisation. Cette situation est identique à une inhibition irréversible. La distinction entre ces deux types d'inhibition est obtenue par la représentation $V_{\max} = f([E_{\text{totale}}])$ (Figure 49.A). Dans le cas d'une inhibition réversible non compétitive, la droite obtenue en présence d'inhibiteur aura une valeur de pente plus faible que la droite contrôle sans inhibiteur tandis que les valeurs des pentes seront constantes pour un inhibiteur irréversible. Nous avons déterminé les V_{\max} en présence du composé SP15 et de 5, 25 et 75 nM de RT. La représentation $V_{\max} = f([E_{\text{totale}}])$ montre clairement une diminution de la pente des droites obtenues en absence ou en présence de l'inhibiteur SP15 (Figure 49.B), ce qui nous permet d'éliminer une inhibition de type irréversible.

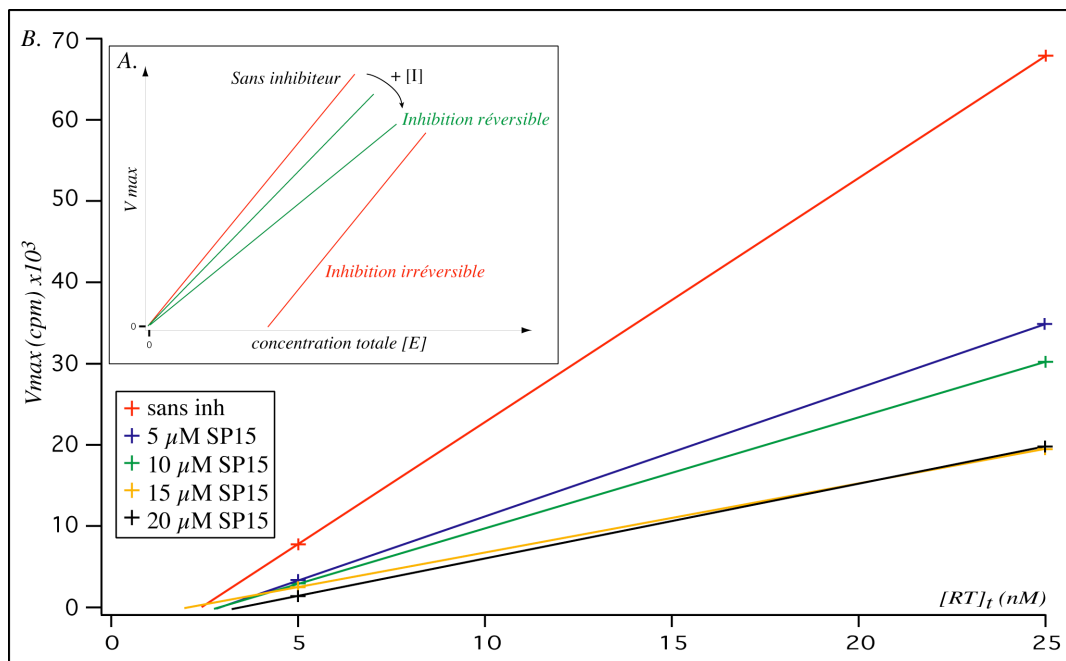


Figure 49 : Inhibitions réversibles et irréversibles.

A. Cas général □ Lors de l'addition d'inhibiteur, la valeur de la pente de la droite $V_{\max} = f([E_{\text{totale}}])$ diminue dans le cas d'une inhibition réversible, mais reste constante pour une inhibition irréversible. **B.** Cas de SP15 □ la diminution progressive de la valeur des pentes lorsque la concentration de SP15 augmente permet de conclure à une inhibition de type réversible.

En résumé, les 3,7-DHT inhibent l'activité polymérase selon un mode d'inhibition réversible non compétitif, vis-à-vis des dNTPs. Ce résultat est inattendu puisqu'il implique une fixation des 3,7-DHT au niveau du site polymérase n'empêchant pas la fixation du dNTP. Or, le dNTP entrant apporte un des deux ions Mg^{2+} nécessaire à la catalyse (89, 91) et, d'après notre hypothèse initiale, les deux Mg^{2+} sont requis pour le mécanisme de chélation. L'implication des cations catalytiques dans le mécanisme d'inhibition a néanmoins été démontrée (cf. figure 4 de Didierjean et al) et une inhibition de la réaction par la fixation des 3,7-DHT à un seul ion Mg^{2+} du site catalytique est envisageable. Un type d'inhibition non compétitif peut également être obtenu par la fixation des 3,7-DHT hors du site catalytique polymérase. Il serait ainsi possible que les 3,7-DHT se lient au site allostérique des NNRTIs ou à un site encore inconnu de la RT. Leur fixation pourrait par exemple induire une inhibition de l'activité polymérase, via un positionnement inadapté des ions Mg^{2+} au niveau du site actif, sans affecter la fixation du dNTP.

La suite du chapitre II est consacré aux différentes expériences qui ont permis de préciser le mécanisme d'action des 3,7-DHT sur l'activité polymérase.

5. Les 3,7-dihydroxytropolones ne se fixent pas dans le site de liaison des NNRTIs

Le mode d'inhibition de type non compétitif des 3,7 DHT rappelle celui des inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTIs) qui se fixent dans une poche hydrophobe à proximité du site catalytique polymérase de la RT du VIH-1 et ralentissent la catalyse (281). Afin de tester la possibilité d'inhibition de l'activité polymérase par les 3,7 DHT via une fixation dans la poche des NNRTIs, nous avons étudié leur effet sur la RT Y181C du VIH-1 ainsi que sur les RT du VIH-2 et du Virus de la Leucémie Murine (MLV).

1. Inhibition de la RT Y181C

La substitution Y181C mute une tyrosine en une cystéine et affecte directement la fixation des NNRTIs (cf. Introduction. II. II. B. 2). Elle confère par conséquent une résistance à de nombreux NNRTIs étudiés. Des cinétiques d'inhibition d'incorporation de dTTP[H³], analogues à celles qui ont été conduites avec la RT sauvage, ont permis de déterminer le K_i de l'inhibition de la RT Y181C.

Les résultats de l'inhibition de cette enzyme mutante par SP15 (Figure 50) montrent qu'il s'agit d'un type d'inhibition similaire à celui de la RT sauvage, non compétitif et dont le K_i ($2,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$) est très proche de celui de la RT sauvage ($5 \pm 0.6 \mu\text{M}$). La mutation Y181C n'a donc pas d'effet sur l'inhibition par le composé SP15, indiquant que le site de fixation des NNRTIs n'est pas impliqué dans le mode d'inhibition de la RT par les composés SP. Il reste néanmoins possible que, comme dans le cas du CP-94,707 (258), la fixation des 3,7 DHT dans le site des NNRTIs soit peu affectée par la seule mutation du résidu Y181.

2. Inhibition de la RT du VIH-2 et la RT de MLV

Pour tester cette éventualité, nous avons étudié l'effet du composé SP15 sur la RT du VIH-2, dépourvue de la poche de fixation des NNRTIs, en raison de la substitution des résidus essentiels à leur fixation, K101A, Y181I et Y188L. Les résultats (Figure 51) montrent une diminution progressive de l'incorporation de dTTP[H³] lorsque la concentration en SP15 augmente.

Par conséquent SP15 inhibe la RT du VIH-2. De la même façon, nous avons montré que la RT de MLV, qui n'est pas inhibée par les NNRTIs, est également inhibée par le composé SP15 (Figure 52). Ces résultats, certes indirects, semblent ainsi exclure une inhibition de la RT du VIH-1 par fixation des 3,7 DHT dans le site des NNRTIs.

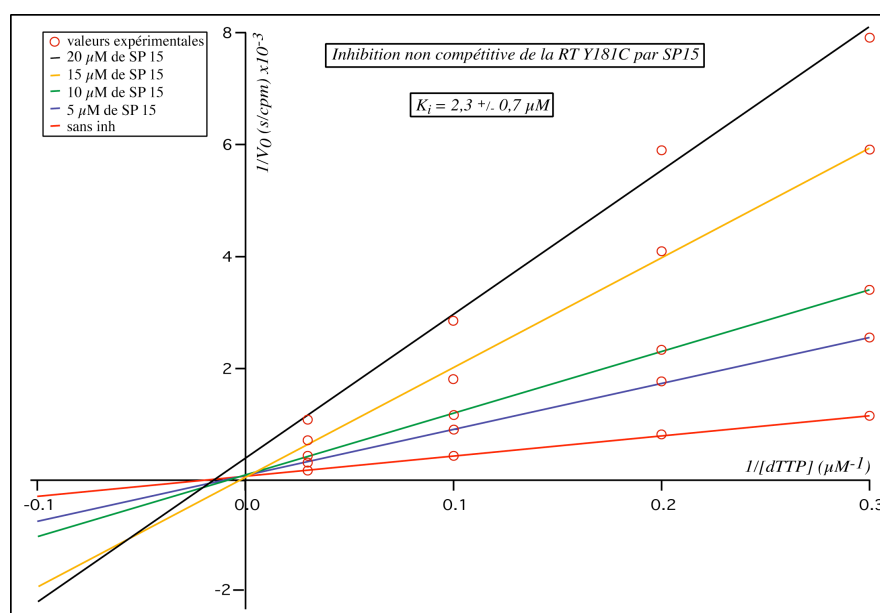


Figure 50 : Inhibition de la RT Y181C par SP15.

L'inhibition de la RT Y181C par SP15 est également non compétitive et son K_i ($2,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$) est très proche de celui de la RT sauvage ($5 \pm 0.6 \mu\text{M}$). La mode opératoire employé est décrit dans la légende de la figure 45*.

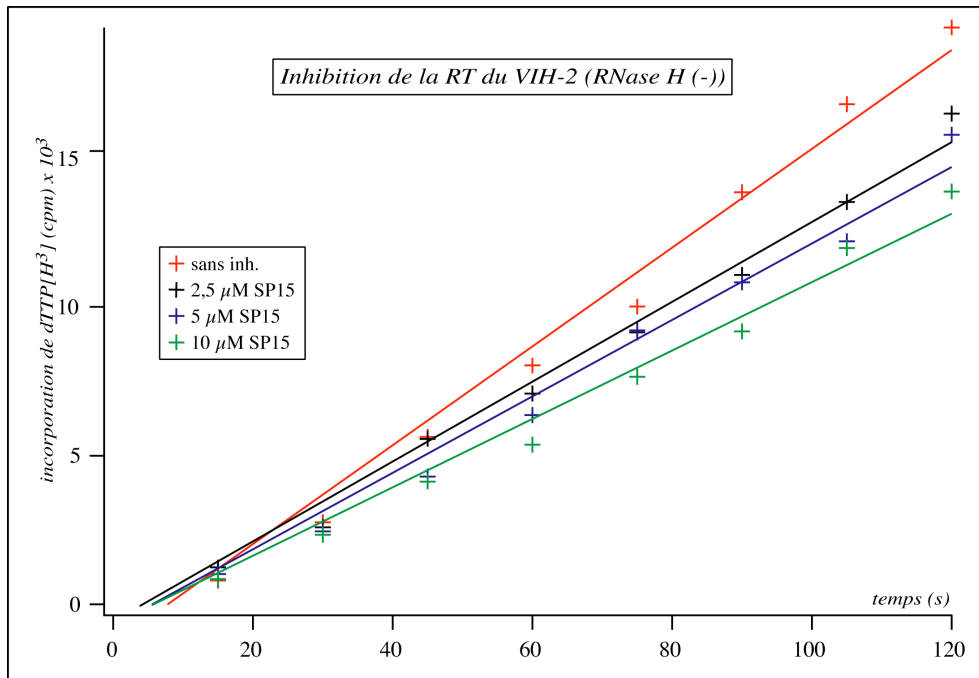


Figure 51 : *Inhibition de la RT du VIH-2 (25 nM) par SP15.*

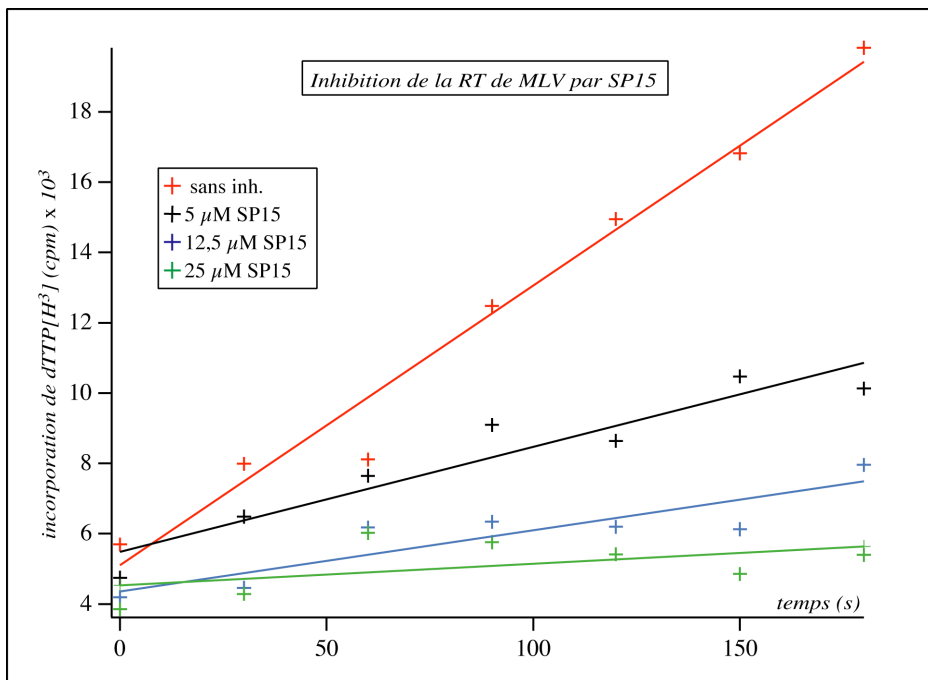


Figure 52 : *Inhibition de la RT de MLV (9 nM) par SP15.*

6. Les 3,7-DHT ne dissocient pas la forme active, hétérodimérique, de la RT du VIH-1

Plusieurs types d'inhibiteurs de la RT du VIH-1, comme le petit peptide Pep-7 (82) ou la N-acyle hydrazone BBNH (306), dissocient la RT active, hétérodimérique. Nous avons réalisé des expériences de gel-filtration afin de tester ce mode d'inhibition potentiel de la RT par les 3,7-DHT. Pour cela, la RT du VIH-1 (10 μ g (350nM)) est pré-incubée (10, 15 ou 25 min) en présence d'inhibiteur SP15 (10, 40 et 500 μ M). Les échantillons sont ensuite déposés sur une colonne HPLC superdex 200, qui permet de séparer les différentes formes oligomériques de la RT, en fonction de leur masse moléculaire apparente.

Les chromatogrammes des gels-filtrations (Figure 53) permettent d'observer et de quantifier les différentes formes, hétérodimérique (p66/p51) ou monomériques (p66 et P51) de la RT du VIH-1. Le rapport R des différentes formes, (R = hauteur du pic de dimères/pic des monomères), permet d'analyser l'effet des 3,7-DHT sur la dissociation de la RT. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de différences significatives entre la RT seule (R = 1,71) et la RT pré-incubée (10, 15 ou 25 min) avec différentes concentrations de composé SP15 (10, 40 ou 500 μ M) ($1,55 < R < 1,77$). Il est à noter que la dernière condition (10 μ g de RT (350nM) pré-incubée pendant 25 min en présence de 500 μ M de SP15) est comparable (excès de 3000 à 4000 x d'inhibiteur) aux conditions d'inhibition dans lesquelles nous avons analysé l'inhibition de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-). En conclusion, nous avons montré que les 3,7-DHT ne dissocient pas la RT dans les conditions dans lesquelles nous avons observé une inhibition, *in vitro*, de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-).

7. Les 3,7- dihydroxytropolones ne fixent pas les acides nucléiques substrats de la RT et de l'IN

Un autre mode possible d'inhibition serait lié à la fixation ou l'intercalation des 3,7-DHT dans les substrats ARN/ADN de la RT pour l'activité RNase H et polymérase ARN-dépendante de la RT, et ADN/ADN pour les activités de l'IN et polymérase ADN-dépendante de la RT.

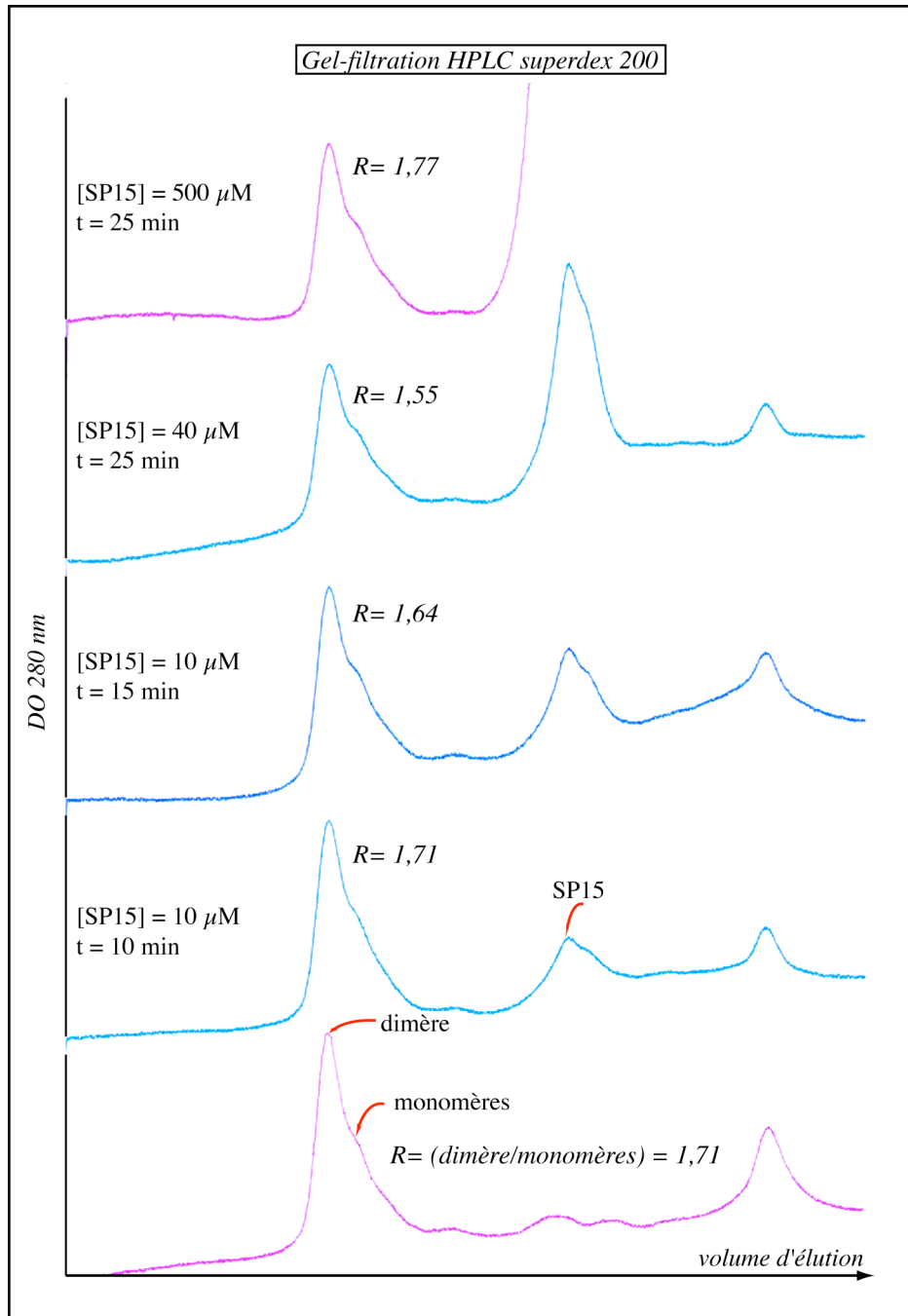


Figure 53 : Effet du composé SP15 sur la dissociation RT du VIH-1.

Dix μ g de RT du VIH-1 sont incubés (10, 15 ou 25 min) à 37°C, en présence de différentes concentrations d'inhibiteur SP15 (10, 40 et 500 μ M), dans le tampon de rétrotranscription standard (50 mM Tris-HCl pH8,5 (37°C), 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂ et 1 mM DTT). Le passage des échantillons sur la colonne Superdex 200 (Amersham Biosciences) est réalisé dans le même tampon. Le rapport $R = \text{dimère}/\text{monomères}$ est évalué et permet de conclure à une inefficacité du composé SP15 à dissocier la forme active de la RT.

Dans ce cas, le substrat deviendrait inaccessible pour une reconnaissance par l'enzyme. Cette hypothèse semble peu probable car les 3,7-DHT sont chargées négativement à pH physiologique (charge négative nette d'environ 1,5 à pH 7) et les 3,7-DHT O-méthylées, non chargées, plus enclin à une fixation aux acides nucléiques, sont complètement inactives. De plus, Budihias et al. (33) ont montré que les dérivés tropoloniques naturels ne lient pas les acides nucléiques. Cependant, afin d'éliminer cette possibilité, nous avons réalisé des cinétiques d'inhibition de l'activité polymérase en présence d'acides nucléiques non-substrats de la RT, ainsi que des analyses de fluorescence.

1. Détermination des K_i d'inhibition de l'activité polymérase en présence d'un acide nucléique hétérologue

Afin de tester une fixation éventuelle des 3,7-DHT au complexe (poly(rA)/(dT)₁₈), substrat de l'activité polymérase la RT, nous avons mesuré les K_i de l'inhibition de l'activité polymérase par SP15, en présence d'ARNt total de levure. Ces acides nucléiques hétérologues présentent des régions doubles et simples brins sur lesquelles pourraient se fixer les composés SP. Différentes quantités d'ARNt (100 nM, 1 et 10 μ M finals) ont été ajoutées au milieu réactionnel en même temps que les 500 nM de complexe (poly(rA)/(dT)₁₈), et nous avons utilisé les conditions standard de détermination du K_i de SP15, sur la RT^{EQ} du VIH-1 (cf. figures 45 et 46). Les résultats de ces expériences d'inhibition ne montrent pas de différences significatives entre le K_i obtenu en l'absence ($K_i = 5 \pm 0,6 \mu$ M) ou en présence d'ARNt. On observe en effet un K_i de $2,8 \pm 1,2 \mu$ M, $2,3 \pm 1,1 \mu$ M et $5 \pm 0,7 \mu$ M en présence, respectivement de 100 nM, 1 μ M et 10 μ M d'ARNt ajoutés.

Ces résultats nous donnent une première confirmation de l'absence de fixation des 3,7-DHT aux régions simple et double brin des acides nucléiques.

2. Analyse de la fixation des 3,7-dihydroxytropolones par fluorescence

Parmi les méthodes physiques d'investigation des milieux biologiques, la fluorescence, de par sa grande sensibilité d'analyse et ses résolutions (spectrales, spatiale, temporelle et d'orientation) offre des possibilités intéressantes en biologie.

Dans l'optique d'observer une éventuelle fixation des 3,7-DHT aux duplexes ADN/ADN (U5A/U5B) ou ARN/ADN (ARN₁₋₄₇/ODN), respectivement substrats des activités de l'IN et de la RNase H de la RT, nous avons mené des expériences de fluorescence à l'état stationnaire, à l'aide d'une molécule fluorescente intercalante des acides nucléiques, le bromure d'ethidium (BEt).

La liaison du BEt aux duplexes ADN ou ARN est séquence dépendante, se produit avec une constante d'affinité variable entre 1 et 500 μM et une stoechiométrie variable (2-5 équivalents de BEt par répétition hélicale) (30). Lors de la liaison du BEt à l'acide nucléique, une importante augmentation de l'émission de fluorescence du chromophore peut être observée (201). Inversement, son expulsion de l'acide nucléique provoque une diminution de la fluorescence émise d'environ 20 fois (300). De ce fait, l'éventuelle fixation des 3,7-DHT aux duplexes ADN/ADN et ARN/ADN pourrait déplacer le BEt de son site de fixation et par conséquent une diminution de la fluorescence devrait être observable.

Des complexes (A/M)BEt (50 nM) sont formés à raison d'une molécule de BEt pour trois paires de base. Les duplexes A/M, U5A/U5B ou ARN₁₋₄₇/ODN sont hybridés comme décrit précédemment (Résultats et discussion, Chap I). Les composés SP15 ou SP20, dilués dans le DMSO, sont ensuite ajoutés à des concentrations croissantes (100 μM final) au milieu réactionnel contenant 50 mM Tris-HCl pH7,5 et 6 mM MgCl₂. La variation de fluorescence est suivie par excitation du BEt à 510 nm et analyse de l'émission de fluorescence à 600 nm. L'influence du DMSO sur le signal du BEt est retranché au signal obtenu en présence des composés SP15 et SP20. Les résultats (Figure 54) ne montrent aucune variation significative du signal de fluorescence lorsque le composé SP est rajouté en solution en quantités croissantes. Un contrôle positif d'expulsion est également réalisé en présence de spermine, une polyamine qui permet l'éjection du BEt (13). Par conséquent, les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence une expulsion significative du BEt par le composé parent SP15, ni par le composé acétylé SP20. Il semble ainsi que les composés SP ne se fixent pas aux acides nucléiques.

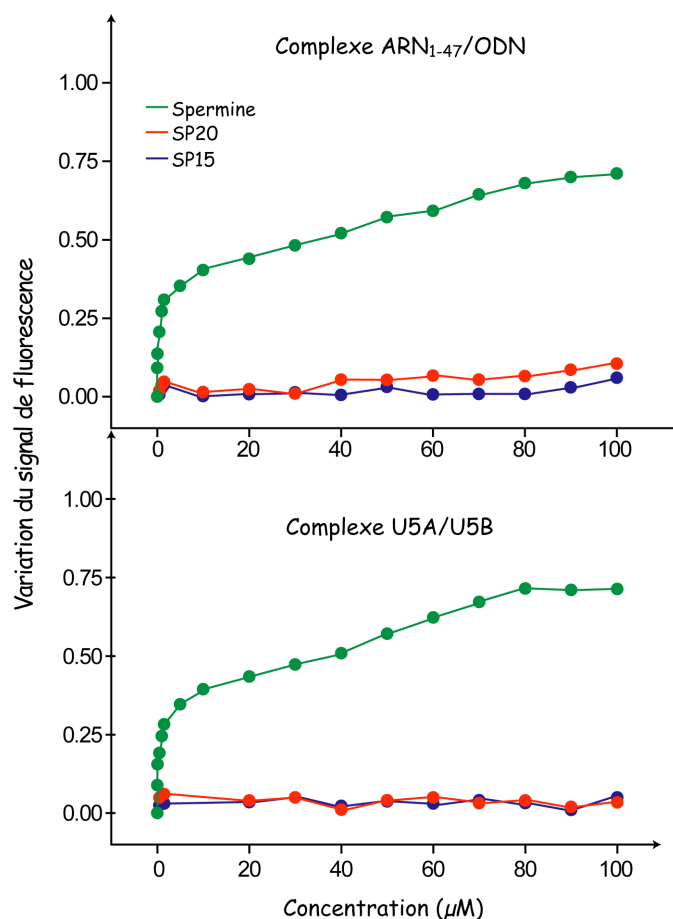


Figure 54 Variation du signal de fluorescence émis par le BEt.

Les substrats (50 nM), ARN/ADN (ARN₁₋₄₁/ODN) et ADN/ADN (U5A/U5B) sont complexés au BEt (1 molécule de BEt pour trois paires de bases). Des concentrations croissantes (de 0 à 100 μM) de spermine ou des composés SP15 ou SP20 ont été ajoutées au milieu contenant 50 mM Tris-HCl pH7,5 et 6 mM MgCl₂. Le fluorophore a été excité à 510 nm et le spectre a été enregistré entre 525 et 700 nm (avec un maximum à 610 nm). Les composés SP15 et SP20 ont été dilués dans du DMSO et le signal de «SP15» (en bleu) et de «SP20» (en rouge) tient compte de l'effet du DMSO sur l'émission de fluorescence du BEt.

En conclusion, les résultats obtenus par la méthode de détermination des K_i en présence d'acides nucléiques hétérologues, ainsi que par des méthodes spectrofluorométriques, montrent que les composés SP15 et SP20 ne se fixent pas aux acides nucléiques, qu'ils soient exogènes à la réaction de polymérisation (ARN_n), ou directement substrats des réactions de l'IN et de l'activité RNase H du VIH-1. En outre, les résultats obtenus par Budihias (33) sur des composés tropoloniques naturels, proches des 3,7-DHT, ainsi que les propriétés électrostatiques des composés SP, confirment que les 3,7-DHT n'inhibent pas les réactions testées en se fixant aux acides nucléiques.

8. *Les 3,7-dihydroxytropolones ne sont pas des inhibiteurs de translocation*

En 2003, l'équipe du Dr. Götte (Mc Gill University, Montréal, Québec) a mis au point une technique d'empreinte site-spécifique permettant d'identifier et de distinguer les états pré- et post-transloqués de la RT du VIH-1 (219) (cf. figure 32). L'étape de translocation (Figures 24 et 55) se produit lors de la réaction de polymérisation, suite à l'addition d'un nucléotide, et doit permettre au complexe A_{+1}/M d'être correctement positionné dans le site catalytique polymérase, afin d'autoriser un autre cycle de polymérisation. La technique développée utilise deux sondes chimiques à l'origine de la formation de radicaux hydroxyles : le $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ et le peroxy-nitrite de potassium (KOONO). Ces radicaux vont induire des coupures spécifiques (219), médiées par des contacts spécifiques avec la RT, sur le brin matrice d'un complexe A/M substrat de la RT. Deux clivages spécifiques, aux positions -8 de la matrice (médié par le KOONO) et -18/-19 (médiés par le Fe^{2+}) (Figure 54) servent de marqueurs pour définir le positionnement des domaines polymérase et RNase H de la RT. Il a été montré que des concentrations croissantes du nt suivant induisent le déplacement des coupures vers les positions -7 et -17/-18 de la matrice. Ainsi, le mouvement de la RT d'un nt défini l'existence d'un équilibre entre un état pré et post-transloqué de la RT (219).

Une collaboration avec l'équipe du Dr. Götte a permis de tester l'effet des 3,7-DHT SP2, SP5 et SP12 sur l'étape de translocation de la RT. Les résultats obtenus ne montrent aucune inhibition significative de la translocation.

En outre, l'étude d'une RT du VIH-1 portant la mutation E89K, qui confère une résistance au foscarnet (315), un inhibiteur de translocation analogue de pyrophosphate, montre que la synthèse de l'ADN "strong-stop" (-) par les RT E89K et WT est inhibée avec la même efficacité par le composé SP15 (Figure 55.B) ($\text{IC}_{50}(\text{SP15})_{\text{WT}} = 4,6 \mu\text{M}$ et $\text{IC}_{50}(\text{SP15})_{\text{EK}} = 5 \mu\text{M}$), tandis que la mutation E89K augmente l' IC_{50} du foscarnet d'un facteur 11,5 ($\text{IC}_{50}(\text{Fosc})_{\text{WT}} = 1 \mu\text{M}$ et $\text{IC}_{50}(\text{Fosc})_{\text{EK}} = 11,5 \mu\text{M}$). Cette absence de résistance envers les composés SP a également été démontrée pour SP12.

Par conséquent, ces résultats démontrent que les 3,7-DHT n'agissent pas au niveau de l'étape de translocation de la RT, lors du processus de polymérisation.

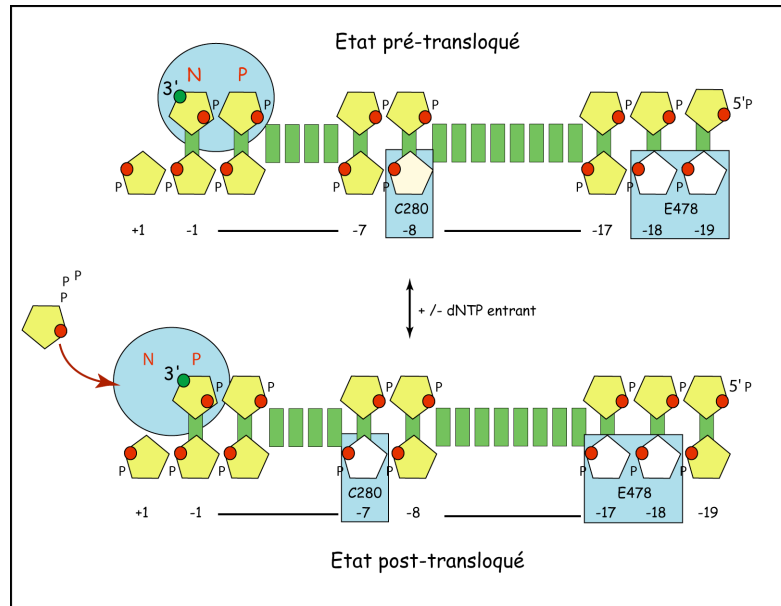


Figure 55.A Caractérisation des états pré- et post-transloqué, basée sur des empreintes site-spécifique (d'après (219)).

La liaison de la RT à un complexe A/M est représenté schématiquement. Les sucres des bases sont représentés en jaune, le groupement 3'OH du résidu 3' terminal de l'amorce par un cercle vert, les liaisons 3'-5' phosphate par des cercles rouges, les appariements entre paires de bases par des rectangles verts. Les sucres représentés en blanc illustrent les coupures sites spécifiques, par le KOONO et le Fe^{2+} , respectivement médiés par les résidus C280 et E478 de la RT. Dans l'état pré-transloqué, l'extrémité 3' de l'amorce occupe le site N. Le déplacement des résidus C280 et E478 d'un nucléotide, illustré par le mouvement des rectangles bleus, doit être accompagné d'un déplacement équivalent au niveau du site actif polymérase (ovale bleu). Ainsi, l'extrémité de l'amorce occupe le site P dans l'état post-transloqué et le dNTP entrant le site N.

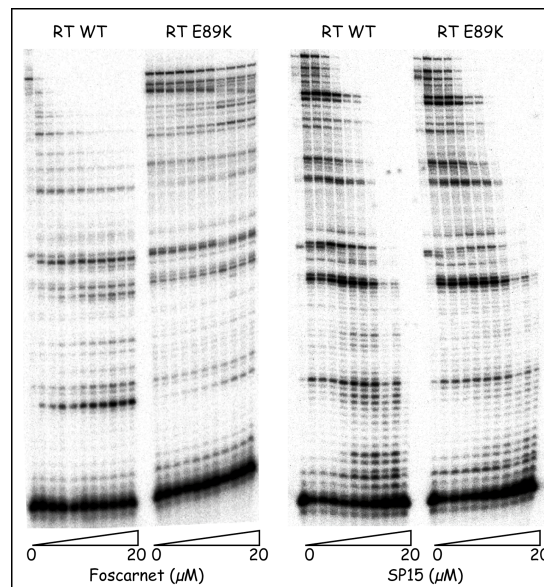


Figure 55.B : Comparaison de l'inhibition de la RT WT et E89K par le foscarnet et SP15.

Les cinétiques d'inhibition de la synthèse de l'ADN "strong-stop" (-) sont réalisées dans les conditions décrites précédemment (cf. Résultats et discussions, Chap I). Seul le prélèvement au temps 30 min est déposé sur gel et la concentration en inhibiteur varie de 0 à 20 μ M.

En conclusion, nous avons montré que les 3,7-DHT sont des inhibiteurs non compétitifs de l'activité polymérase, vis-à-vis des dNTPs. Cette inhibition, réversible, n'implique pas la fixation des 3,7-DHT au site de fixation des NNRTIs, ni aux acides nucléiques, substrats des activités de la RT et de l'IN du VIH-1. De plus, ils ne dissocient pas la forme active, hétérodimérique de la RT et ne sont pas des inhibiteurs de l'étape de translocation de la RT.

Chapitre III : Essais de cristallisation d'un complexe (amorce/matrice):RT:dNTP contenant une 3,7-dihydroxytropolone

I. Obtention du complexe (A/M):RT pontée

A. Stratégie (Figure 56.A et B)

Bien que les expériences précédentes tendent à prouver, indirectement, notre hypothèse initiale de chélation des ions magnésium, le site de fixation exact ainsi que le mécanisme d'inhibition des 3,7-DHT restent incertains. De plus, l'amélioration des composés de première génération passe par l'étude des relations structures/activités. Les premiers indices ont été obtenus par l'étude des composés mono/disubstitués (cf. Résultats et discussion Chap I), mais cette stratégie de «drug-design» ou conception rationalisée d'inhibiteurs nécessite de connaître exactement l'environnement protéique du ou des sites de fixation des inhibiteurs potentiels. Par conséquent, nous avons voulu obtenir une structure cristallographique de la RT du VIH-1 complexée à une 3,7-DHT.

Les expériences réalisées en présence d'héparine (Figure 43, cf. Résultats et discussion Chap II. I.) ont montré que les 3,7-DHT inhibent la RT du VIH-1 en se fixant au complexe ternaire RT:(A/M), et que la présence de l'inhibiteur n'affecte pas la fixation du dNTP entrant et vice-versa. Eu égard à ces divers éléments, notre objectif a été de cristalliser la RT du VIH-1 sous sa forme active de polymérisation, c'est-à-dire en présence d'un complexe A/M et d'un nucléotide entrant, le ddTTP, en présence d'une 3,7-DHT (Figure 56.B).

Nous nous sommes inspirés des travaux du groupe du Dr. G. Verdine (Harvard University, Cambridge, USA) qui a mis au point une stratégie de pontage d'un complexe A/M à la RT du VIH-1, via un pont disulfure (154). Cette stratégie nécessite l'introduction par mutagenèse dirigée d'une cystéine à la position Q258 de la sous-unité p66, ainsi que l'introduction d'un groupement C3-thiol sur la position N-2 d'une guanine

de l'amorce, localisée à cinq bases du nucléotide présent dans le site actif (Figure 56.A et B).

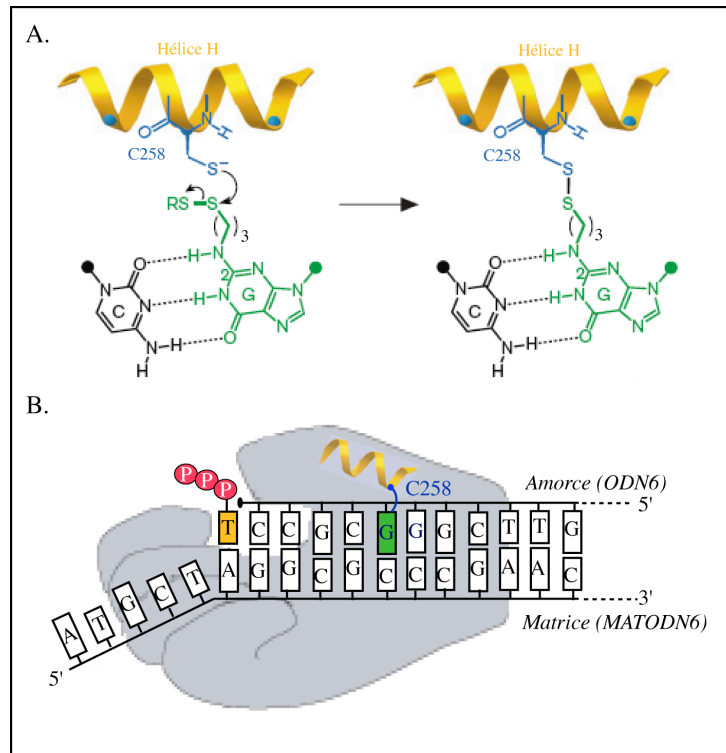


Figure 56 Formation du pont disulfure entre la RT du VIH-1 et une guanine modifiée de l'amorce.

A. La chaîne latérale de la cystéine C258 (bleue) de l'hélice H (or) forme un pont disulfure avec la guanine modifiée de l'amorce (vert) et le groupement SR (3 aminopropylthiol) est libéré. **B.** Schéma résumant la stratégie employée. La partie simple brin de la matrice est représentée devant les doigts alors qu'elle passe normalement au travers du sillon du site actif.

B. Purification du complexe

Le clone de la RT du VIH-1 utilisée pour le pontage (RT^{QC}), nous a été fourni par le groupe du Dr E. Arnold (Rutgers University, Piscataway, New Jersey), qui a également utilisé la stratégie décrite par le groupe du Dr G. Verdine (153) afin d'étudier les formes pré- et post-transloquées de la RT du VIH-1 (290). Le plasmide permet la surexpression simultanée des deux sous-unités de la RT dans *E. coli* (Figure 57). La sous-unité p66 possède la mutation Q258C, qui procure la cystéine de l'hélice H du pouce, impliquée dans le pontage. Une mutation C280S est également présente sur les deux sous-unités et permet d'exclure un pontage sur cette cystéine proche du site actif. Enfin, l'extrémité C-terminale de p51 permet une purification aisée de la RT : le résidu 428 est remplacé par une extension comprenant deux glycines et sept histidines.

Résultats et Discussion

Etape	Tampon
1. Culture <i>E.coli</i> Rosetta BL21	Luria Bertani
2. Purification sur colone Ni-NTA RT retenue	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8 300 mM NaCl + ----- Lyse 10 mM imidazole ----- Lavage 20 mM imidazole ----- Elution 250 mM imidazole
Dilution 5 fois avec 50 mM Tris-HCl pH 8 (20°C)	
3. Purification sur colone héparine RT retenue	20 mM Tris pH 8 à 20°C 0,1 mM EDTA + ----- Lavage 100 mM NaCl ----- Elution 1 M NaCl
4. Dialyse Système Amicon (Millipore)	10 mM MES pH 6,5 2 mM MgCl ₂
5. Concentration Centricon 50k (Millipore)	200 mM NaCl 0,02 mM EDTA
6. Hybridation matrice ADN/amorce ADN Matrice MATODN6 5'-ATG CTA GGC GCC CGA ACA GGG ACT GTG-3' Amorce ODN6 5'-AC AGT CCC TGT TCG G ^{S-SR} GC GCC-3' Rapport molaire MATODN6/ODN6 = 2/1	100 mM NaCl 3 min à 90°C 2 min glace 25 min à 54°C "Slow-cooling" 30 min à T ambiante
7. Pontage Rapport molaire (MATODN6/ODN6)/RT = 2,5 3H à 37°C puis 16h à 25°C + 1 mM DTT (évite les pontages aspécifiques)	50 mM TrisHCl pH 7,4 25 mM NaCl 25 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 5% glycérol
8. Purification sur colone Ni-NTA ADN non ponté dans l'effluent RT pontée et non pontée retenues	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8 300 mM NaCl + ----- Lavage 20 mM imidazole ----- Elution 250 mM imidazole
Dilution 5 fois avec 50 mM Tris-HCl pH 8 (20°C)	
9. Purification sur colone héparine RT pontée dans l'effluent RT non pontée retenue	
10. Dialyse Système Amicon (Millipore)	10 mM MES pH 6,5 2 mM MgCl ₂
11. Concentration du complexe RT ^{QC} -(A/M) Centricon 50k (Millipore)	200 mM NaCl 0,02 mM EDTA

Figure 57 Protocole d'obtention de la RT du VIH-1 pontée au duplex ODN6/MATODN6.

Le groupement SR présent dans l'oligonucléotide ODN6 représente le 3 aminopropylthiol, qui sera remplacé par la chaîne latérale du résidu C258 de la RT^{QC} lors de la réaction de pontage.

La première purification (Figure 57) de la RT^{QC} est ainsi réalisée à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA. L'éluat obtenu est dilué cinq fois afin que la RT^{QC} puisse être retenue, par affinité, sur une colonne héparine. L'activité polymérase de la RT^{QC} ainsi produite a été testée lors de réaction de synthèse d'ADN «strong-stop» (-). Les résultats (Figure 58) montrent une activité comparable à celle de la RT sauvage. Par conséquent la RT^{QC} utilisée pour les études de cristallographie est bien une enzyme active.

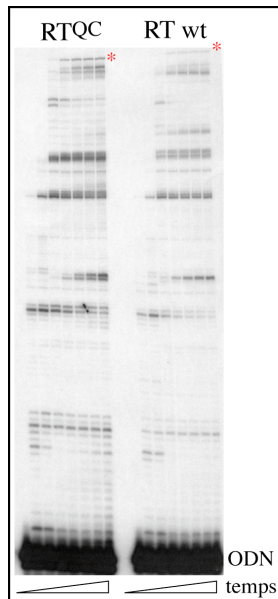


Figure 58 Test d'activité de la RT^{QC}.

L'activité polymérase de la RT^{QC} a été testée en suivant la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-)*. Les cinétiques d'élongation sont réalisées comme précédemment (cf. Chap II. I), en présence de 30 nM de RT^{QC} ou sauvage. Les différents temps correspondent à 0, 30 s, 1, 5, 10, 20, 30 et 40 min d'extension.

La matrice MATODN6 (Figure 57) a été produite par des méthodes standards (Eurogentec) tandis que l'amorce ODN6 (Figure 57) a été synthétisée au laboratoire par V. Vivet. Une guanine, comportant un groupement fluor en position G2, est incorporée à cinq bases de l'extrémité 3'_{OH} de l'amorce. Elle permet la formation d'un bras C3-thiol, suite à une réaction de substitution avec du bis (3-aminopropyl) disulfide dihydrochlorure. Lors de la réaction de pontage, la seconde partie du bras (3 aminopropanethiol) est substituée par la chaîne latérale du résidu C258 (Figure 56.A), ce qui permet la liaison covalente de la RT^{QC} au duplexe ADN/ADN par un pont disulfure.

Nous avons, dans un premier temps, optimisé les conditions d'hybridation de l'amorce ODN6 à la matrice MATODN6 ainsi que les conditions de pontages du complexe A/M à la RT^{QC}.

Des expériences d'hybridation de l'ODN6, marqué radioactivement, ont été réalisées sur un gradient de températures croissantes (40 à 76°C), de rapports molaires ODN6/MATODN6 décroissants (1/1, 1/2, 1/3 et 1/4) et pendant des temps d'incubation variables. Les hybrides sont visualisés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant, puis quantifiés. Un rendement optimal d'hybridation, de 80%, a été observé lorsque l'hybridation est réalisée à 54°C, en présence d'une quantité deux fois plus importante de matrice MATODN6 par rapport à l'amorce ODN6 (Figure 57).

Par ailleurs, l'influence de la concentration en DTT (0, 1, 2, 3 et 4 mM), qui permet d'éviter les pontages aspécifiques du complexe A/M à la RT^{QC}, a été testée sur différents rapports de complexes RT^{QC}:(A/M) = 1/1, 1/2, 1/2,5, 1/3 et 1/4), ont été réalisées. L'analyse des produits de pontage, sur gel de polyacrylamide dénaturant non réducteur, permet de visualiser, après coloration au bleu de Coomassie, les sous-unités p66-pontée, p66 et p51. Les conditions optimales de pontage (rendement d'environ 70%) ont été obtenues en présence d'un rapport molaire RT^{QC}:(A/M) égal à 1/2,5 et de 1mM de DTT (Figure 57).

Enfin, le complexe RT^{QC}:(A/M) est à nouveau purifié sur les supports Ni-NTA et héparine (Figure 57), ce qui permet d'éliminer l'excès d'ADN ainsi que la RT^{QC} non-pontée. Le complexe RT^{QC}:(A/M) ainsi purifié est dialysé dans un tampon de cristallisation adéquat puis concentré.

II. Cristallogénèse

A. Utilisation de différentes conditions de cristallisation

Les premières tentatives d'obtention de cristaux ont été réalisées dans des conditions se rapprochant de celles qui ont été décrites par Huang ((154), figure 59). Différentes concentrations de complexe RT^{QC}:(A/M) (8, 10 ou 12 mg.ml⁻¹ final) ont été mises en présence de différentes concentrations en agent cristallisant (12, 14 ou 16% de PEG 6000), d'un inhibiteurs (SP2, SP5, SP12, SP15 ou le foscarnet) et de nucléotides entrants (dNTP et/ou ddNTP). L'utilisation d'un robot (Mosquito™, TTP LabTech) permet l'automatisation et l'uniformisation des dépôts et présente aussi l'énorme avantage de réduire fortement la quantité de matériels utilisé, en raison de la possibilité de générer des gouttes de volume inférieur à 100 nl.

En parallèle, nous avons utilisé les kits de cristallisation Index et Natrix (Hampton Research) qui permettent de cribler respectivement 96 et 48 conditions, optimisées pour la cristallisation de complexes acides nucléiques/protéines. Ils associent différents tampons (MES, cacodylate de sodium, HEPES...), à différents pH, divers sels (sulfate de magnésium, chlorure de potassium, acétate d'ammonium...) ainsi que différents agents précipitant (PEG, sulfate d'ammonium, isopropanol...). La figure 59 résume les différents modes opératoires utilisés.

B. Obtention de cristaux

Ce sont ainsi plus de 650 différentes conditions de cristallisation, pour lesquelles le rapport (A/M)-RT^{QC}/inhibiteur et (A/M)-RT^{QC}/nucléotide sont respectivement de 2 et 1, qui ont été criblées. Nous n'avons malheureusement pas observé de cristaux lors de l'utilisation des conditions de cristallisation proches de celles qui ont été employées précédemment (153). Cependant, des cristaux se sont développés dans certaines conditions des kits Natrix (0,01 M MgSO₄, 0,05 M cacodylate de sodium pH 6,5, 2 M sulfate d'ammonium) et Index (0,1 M Bis-tris pH 5,5, 2 M sulfate d'ammonium). Ils sont apparus après une semaine à 20°C, dans les gouttes SP2 + ddTTP, SP12 + ddTTP et SP15 + ddTTP. Ces cristaux, de faible taille (de l'ordre de 50 μm sur 40 μm) ont été congelés dans de l'hexane puis mis à diffracter aux rayons-X, au laboratoire.

Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de cliché de diffraction, peut-être en raison de la faible taille/qualité des cristaux, de la puissance de la source de lumière utilisée et/ou du mode de congélation.

	<i>RT^{QC}-(A/M)</i>	<i>Agent cristallisant</i>	Inhibiteur + nucléotide entrant
Screen proche des conditions utilisées par Huang *	0,25, 0,3, ou 0,35 μl (8, 10 ou 12 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ final)	0,1 μl 12, 14 ou 16% PEG 6000 50 mM MES pH 6,5 1 M NaCl 10 mM MgCl_2 0,1 mM EDTA	0,1 μl SP2, SP5, SP12, SP15 ou le foscarnet + ddTTP, dTTP, dTTP + ddATP, dTTP + dATP ou ddTTP+ dATP
Screen Index (Hampton Research)	0,3 μl (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ final)	0,1 μl condition Index (96)	0,1 μl SP2, SP12 ou SP15 + ddTTP
Screen Natrix (Hampton Research)	0,3 μl (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ final)	0,1 μl condition Natrix (48)	0,1 μl SP2, SP12 ou SP15 + ddTTP
0,01 M MgSO_4 0,05 M cacodylate de sodium pH 6,5 2 M sulfate d'ammonium	1,2 μl (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ final)	0,4 μl condition Natrix n°19	0,4 μl SP2, SP12, SP15 ou le foscarnet avec ou sans ddTTP ou dTTP

Figure 59 Conditions de formation des gouttes de cristallisation.

Le tableau résume les différentes combinaisons qui ont été utilisées lors des essais de cristallisation. Le rapport molaire (A/M)-RT^{QC}/inhibiteur = 1/2 et le rapport (A/M)-RT^{QC}/(dNTP ou ddNTP) est équimolaire. * D'après(153).

Les conditions d'obtention des cristaux ont ensuite été améliorées (Figure 59). Nous avons déposé des gouttes suspendues de 2 μl , issue de la condition Natrix précédente, en présence des inhibiteurs SP2, SP12, SP15 ou du foscarnet, qui est un inhibiteur de la RT analogue de pyrophosphate, ainsi que de dTTP ou de ddTTP. Nous avons ainsi pu reproduire des cristaux de même forme, mais de taille et de qualité supérieure. La figure 60.1 montre trois exemples de puits contenant des cristaux. Les cristaux issus des puits SP12 + dTTP (A) et SP15 + dTTP (B) ont toujours été de taille supérieure aux cristaux obtenus en présence de foscarnet + ddTTP. Néanmoins, les rapports (A/M)-RT^{QC}/inhibiteur = 2 et (A/M)-RT^{QC}/nucléotide = 1 n'ont pas été optimisés.

Une fois congelés dans l'hexane, ces cristaux ont été soumis à une puissante source de rayons-X, au SLS (Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Suisse). Une dizaine de cristaux ont été testés, mais aucun n'a permis d'obtenir un cliché de diffraction. Néanmoins, au moment de leur décongélation, les cristaux sont apparus beaucoup plus opaques que lors de leur congélation. Ainsi l'absence de diffraction pourrait provenir de l'étape de congélation, qui s'est déroulée en l'absence d'agent cryoprotectant.

Afin de savoir si ces cristaux contiennent bien la RT pontée, nous avons dissout, après lavages, le cristal A. Un aliquot de la solution obtenue a été déposé sur un gel de polyacrylamide, dans des conditions permettant de conserver le pontage entre la sous-unité p66 et l'ADN. Les résultats (Figure 60.2) montrent très clairement qu'au sein du cristal, la sous-unité p66 est restée pontée au duplex ADN et que la RT^{QC} n'est pas dégradée. Néanmoins nous n'avons pas d'information quant à la présence de l'inhibiteur et du dTTP dans le cristal.

Pour conclure, l'approche employée semble reproductible et adéquate. L'amélioration des conditions de congélation devrait permettre d'obtenir un cliché de diffraction et éventuellement des informations directes quant au(x) site(s) de fixation des 3,7-DHT.

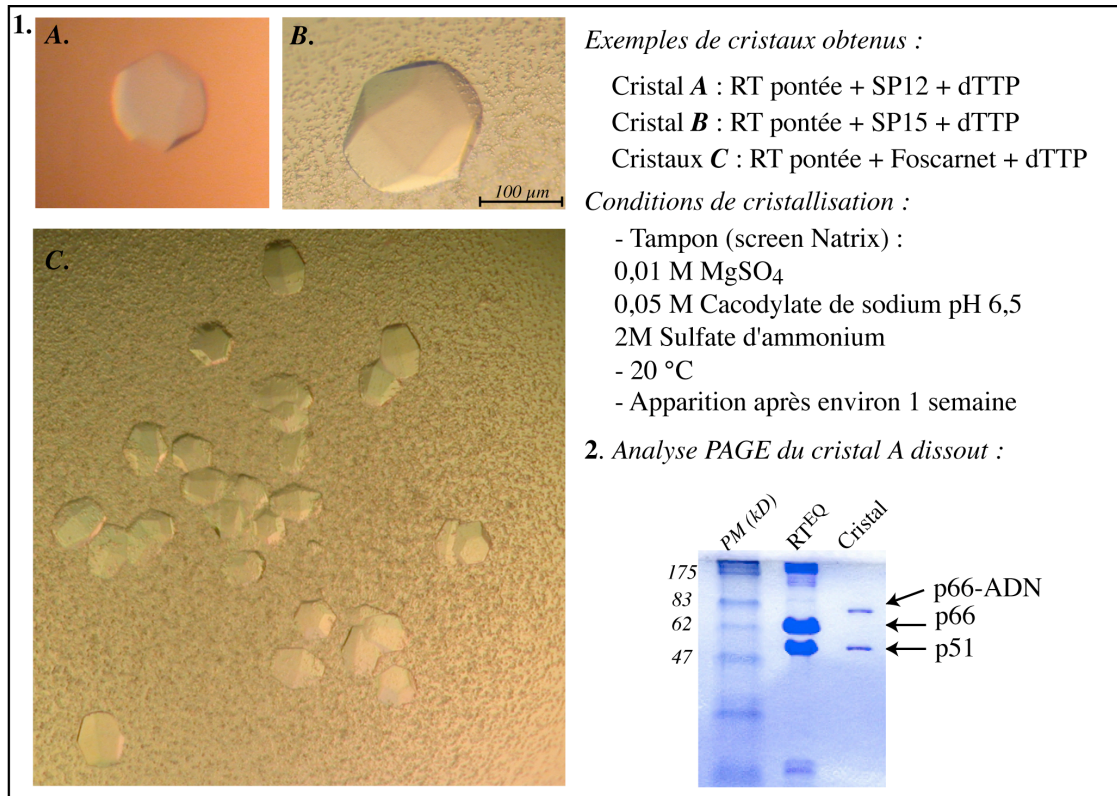


Figure 60 Exemples de cristaux obtenus et composition du cristal A.

1. Photographies de cristaux obtenus en présence de SP12 (A.), SP15 (B.) ou du foscarnet (C.), et conditions d'obtention **2.** Analyse du cristal A sur gel de polyacrylamide dénaturant 15% (sans agent réducteur, coloration au bleu de Coomassie). Le poids moléculaire des protéines présentes dans le cristal correspond bien à celui des deux sous-unités de la RT du VIH-1. Le témoin RT^{EQ} permet de visualiser la différence de poids moléculaire entre p66 et p66-ADN. Le cristal A contient par conséquent la RT^{QC} pontée au duplex ADN et elle n'est pas dégradée.

Chapitre IV□: Etude de l'effet de la concentration en magnésium sur la rétrotranscription du VIH-1 et sur son inhibition

I. Objectifs

La RT du VIH-1 est une métalloenzyme dont les activités dépendent de la présence de cations divalents (cf. Introduction Chp I. 2. B a. iii et iv). Les structures cristallographiques du site catalytique polymérase montrent la présence de deux ions Mg^{2+} (153) tandis que la nature et le nombre de cations divalents impliqués dans l'activité RNase H restent controversés (72, 153, 257). L'activité polymérase a été décrite comme suivant une courbe en cloche en fonction de la concentration en Mg^{2+} , avec un maximum d'activité entre 3 et 8 mM, lorsqu'un ARN homopolymérique est utilisé comme substrat (54, 342). De plus la substitution des ions Mg^{2+} par des ions Mn^{2+} diminue fortement l'activité polymérase (54). D'autre part, l'activité RNase H est plus efficace en présence d'ions Mn^{2+} que d'ions Mg^{2+} (182) et la concentration en Mg^{2+} peut varier entre 4 et 12 mM, sans effets significatifs sur l'activité RNase H (311).

Ainsi, les études d'activité de la RT du VIH-1 sont couramment réalisées en présence de 6-8 mM de Mg^{2+} , car cette concentration permet d'obtenir une catalyse optimale pour les deux activités, polymérase et RNase H, en utilisant respectivement un complexe oligo(dT)/poly(rA) et poly(dC)/poly(rG) comme substrat. Cependant, en raison du pool de Mg^{2+} liant les acides nucléiques et les nucléotides, la concentration intracellulaire de Mg^{2+} libre est certainement très inférieure à 6 mM. Ainsi, les concentrations en Mg^{2+} libre, mesurées dans le sang (335), dans le cerveau (119) et dans les lymphocytes (79, 80) sont respectivement d'environ 0,25 à 0,75, 0,2 et 0,25 mM.

Nous avons par conséquent entrepris d'étudier l'effet de la concentration en Mg^{2+} libre sur la rétrotranscription d'une matrice ARN naturelle et homopolymérique, sur son inhibition par les NRTIs et sur l'excision de l'AZTMP incorporé par une RT AZT résistante, en présence ou en absence de concentration d'ATP physiologiques. L'incorporation de nucléotides, la processivité de la RT, l'inhibition de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-) par les NRTIs, ainsi que l'activité RNase H polymérase-dépendante ont été évaluées dans le cadre de la variation de la concentration en magnésium libre.

Publication soumise à Nucleic Acids Research (NAR)

**Mg²⁺ dependency of HIV-1 reverse transcription, inhibition by nucleoside analogues
and resistance**

Valérie Goldschmidt, Joël Didierjean, Bernard Ehresmann, Chantal Ehresmann, Catherine Isel, and Roland Marquet¹

Unité Propre de Recherche 9002 du CNRS conventionnée à l'Université Louis Pasteur, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France.

¹Corresponding author: phone: (+33) 3 88 41 70 54; fax: (+33) 3 88 60 22 18; e-mail: r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr

Running title: Mg²⁺ concentration and HIV-1 reverse transcription

Keywords: DNA Synthesis / Human Immunodeficiency Virus / Magnesium / NRTI / Resistance / RNase H

Abstract

Metal ions are essential for DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase (RT). RT studies are routinely performed at 6-8 mM Mg²⁺, despite the fact that the *in vivo* concentration might be as low as 0.2 mM. We studied the influence of MgCl₂ and ATP, which likely binds a significant fraction of the magnesium pool *in vivo*, on the DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 RT, its inhibition by nucleoside RT inhibitors (NRTIs), and primer unblocking by AZT-resistant RT. At low Mg²⁺ concentration, reverse transcription of a natural template strongly increased despite a dramatically reduced intrinsic polymerase activity under such conditions. Low Mg²⁺ concentrations affected the RNA stability and indirectly decreased its degradation by the RNase H activity. The reduced RNA degradation prevented premature dissociation of the template and primer strands that otherwise generated dead-end DNA products. In addition, low Mg²⁺ dramatically decreased the incorporation of NRTIs into DNA and increased nucleotide excision by AZT-resistant RT. The latter effect is also most likely due to the diminished cleavage of the RNA template. Thus, differences in the free Mg²⁺ concentration between different cell types or during the cell cycle might strongly affect HIV-1 replication and its inhibition.

Introduction

Reverse transcriptase (RT) is a key enzyme in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and one of the main targets of antiviral therapy (reviewed in 1-4). Its DNA polymerase and RNase H functions are essential for synthesis of the proviral DNA (5). Both catalytic sites bind metal ions (most likely Mg²⁺ *in vivo*). Two Mg²⁺ ions separated by ~3.6 Å have been observed in the polymerase active site of RT in complex with a primer/template DNA duplex and an incoming nucleotide (6). The three aspartate residues that bind Mg²⁺ (D110, D185 and D186) and the metal ions themselves are essential for DNA synthesis (7, 8). Divalent metal ions are also essential for HIV-1 RNase H activity (9), but the number of ions involved in the RNA cleavage reaction is still unclear (10 and references therein). Two Mn²⁺ ions separated by ~4 Å have been observed in the isolated HIV-1 RNase H domain (11), whereas only one Mg²⁺ ion was seen in the RNase H domain of RT bound to a DNA duplex, in the presence of an incoming dNTP (6). However, the recent crystal structures of wild type and catalytically inactive bacterial RNase H complexed with RNA/DNA hybrids showed that the four carboxylate residues of the catalytic site bind two Mg²⁺ ions separated by 4.1 to 4.4 Å (12).

Despite this fact, the influence of the Mg²⁺ concentration on reverse transcription is not well documented. With homopolymeric RNA templates, HIV-1 RT polymerase and RNase H activities were found to be optimal at 3 to 8 mM and 4 to 12 mM Mg²⁺, respectively (13-16), but the effect of the magnesium concentration on reverse transcription of natural RNA templates remains largely unknown. RT studies are routinely performed at 6-8 mM Mg²⁺, despite the fact that the *in vivo* magnesium concentration might be significantly lower: for instance, the Mg²⁺ concentration is 0.21-0.24 mM in the brain (17), ranges from 0.25 to 0.75 mM in blood (18), and is 0.24±0.03 mM in human lymphocytes, one of the main HIV-1 targets (19). In addition, most intracellular magnesium is bound to DNA, RNA, dNTP and

NTP (of which ATP is the most abundant: the intracellular ATP concentration is typically between 1.3 and 4.3 mM (19, 20)) and the critical parameter is likely the concentration of free Mg²⁺ ions.

Nucleoside RT inhibitors (NRTIs) constitute one of the main class of anti-HIV drugs (reviewed in 2-4, 21, 22), but little is known about the influence of the Mg²⁺ concentration on their incorporation efficiency. Since the Mg²⁺ ions of the polymerase active site do not interact with the 3' hydroxyl group of the incoming dNTP (6), the Mg²⁺ concentration is not expected to be a major determinant of the NRTI efficiency. However, it was shown that AZTTP and d4TTP require higher Mg²⁺ concentration than dTTP for optimal incorporation, pointing at the importance of this parameter (23).

As for other antiviral drugs, prolonged treatments with NRTIs select for mutations in the RT gene that confer resistance to these nucleoside analogues (3, 21, 24, 25). These mutations decrease the incorporation of the chain terminators into DNA or/and favor primer unblocking by excision of incorporated NRTIs (24, 26). Both resistance mechanisms might potentially be affected by the magnesium concentration. However, this has not been studied to date.

Here, we studied reverse transcription of a natural RNA template, its inhibition by nucleoside RT inhibitors (NRTIs), primer unblocking by AZT-resistant RT, as well as RNase H activity, at different magnesium concentrations, in the presence or absence of physiological ATP concentration. We found that the concentration of free Mg²⁺ ions has dramatic effects on these reactions. Thus, differences in the free Mg²⁺ concentration between different cell types or during the cell cycle might strongly affect HIV-1 replication and its inhibition by NRTIs. In addition, our results have important implications for screening and testing of candidate NRTIs.

Materials and Methods

ODN, an 18-mer DNA complementary to the PBS, was chemically synthesized and 5' end-labeled with [³²P]ATP and polynucleotide kinase from phage T4. The template RNA,

encompassing nucleotides 1 to 311 of HIV-1 MAL genomic RNA, was transcribed *in vitro* and purified as described (27). A plasmid expressing wild type (wt) HIV-1 RT was kindly provided to us by Dr. Torsten Unge (Uppsala, Sweden), together with the protocols for protein overexpression and purification. RNase H(-) HIV-1 RT bearing the E478Q point mutation, AZT-resistant RT bearing mutations D67N, K70R, T215F and K219Q, and 3TC-resistant RT bearing mutation M184V were purified essentially as described (28). AZTTP, d4TTP and 3TCTP stock solutions were obtained from Moravек Biochemicals and treated with 0.5 unit of pyrophosphatase (Roche Molecular Biochemicals) for 1 h at 37°C in 100 μ l of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM dithioerythritol, in order to prevent contamination with PPI. Pyrophosphatase was removed by filtration through a Centricon 10 (Amicon) device.

Determination of the RT activity on poly(rA) template was performed as followed. Poly(rA)/(dT)₁₈ (500 nM) was extended by 25 nM wt RT in the presence or absence of 3.5 mM ATP and 1 μ M [³H]-dTTP and various MgCl₂ concentrations. Aliquots were withdrawn every min and analyzed on a 96 well filtration unit (MultiScreen_{HTS} Vacuum Manifold, Millipore). The fiber glass membranes (Millipore) were pre-incubated at 4 °C with 100 μ l of 5% TCA, and the samples were further incubated in TCA for 30 min. After filtration, the membranes were washed twice with 100 μ l ice-cold 5% TCA and once with ethanol. The membranes were dried, placed into two ml of Ecoscint OTM, and radioactivity was counted. For each MgCl₂ concentration, the initial velocity (Vi) was determined by plotting the amount of incorporated radioactivity versus time.

For ssDNA synthesis, template RNA and ³²P-labeled ODN were denatured in water for 2 min at 90 °C, chilled on ice, and incubated at 70 °C for 20 min in sodium cacodylate (pH 7.5) 50 mM, KCl 300 mM. The annealing efficiency was routinely checked by native 8% polyacrylamide gel electrophoresis. The primer/template complex (10 nM final concentration) and the four dNTPs (50 μ M each) were pre-incubated for 4 min at 37 °C in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1 to 6 mM MgCl₂, 1 mM DTE, with or without 3.5 mM ATP, AMP, EDTA, or EGTA. Reverse transcription was initiated by adding 25 nM RT in the

same buffer. DNA synthesis was stopped at different time intervals by adding an equal volume of formamide containing 50 mM EDTA. To study the inhibition of reverse transcription by NRTIs, DNA synthesis was performed in presence of 4 or 5 μ M of AZTTP, d4TTP, 3TCTP, ddCTP, or ddATP. The products were analyzed on 15 % denaturing polyacrylamide gels and quantified with a BioImager BAS 2000 (Fuji).

Two polymerase-dependent RNase H assays were performed. The first one has been recently described elsewhere (Didierjean *et al.*, submitted). Briefly, a 5'-end labeled RNA template encompassing nucleotides 1 to 47 of HIV genomic RNA (RNA1-47) was annealed to a DNA oligonucleotide (ODN35), and 10 nM of ODN35/RNA1-47 complex were added to 10 nM wt HIV-1 RT in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1 to 6 mM MgCl₂, 1 mM DTE, with or without 3.5 mM ATP. RNase H cleavage was carried out for 15 s to 30 min and stopped by mixing an equal volume of formamide containing 50 mM EDTA. Cleavage products were resolved using denaturing 15% polyacrylamide gels and quantified as described above. The cleavage rate constant were determined by fitting the experimental data to an exponential equation. In the second assay, we used unlabeled ODN annealed to 5'-end labeled RNA1-311, and we directly followed cleavage of the RNA template during ssDNA synthesis, which was performed as described above.

Results and Discussion

Influence of ATP and Mg²⁺ on the RT polymerase activity

The main goal of this study was to examine the influence of the free Mg²⁺ concentration on reverse transcription of a natural RNA template. However, as we expected Mg²⁺ to have pleotropic effects on the polymerase and RNase H RT activities and on the structure and stability of the RNA template, we first analyzed the RT polymerase activity on poly(rA), which is devoid of secondary structure.

We performed steady-state kinetics of reverse transcription of poly(rA) at various MgCl₂ concentrations, ranging from 1 to 10 mM, in the absence and presence of 3.5 mM ATP, which is likely the main intracellular Mg²⁺ ligand. This ATP concentration is intermediate between that found in human lymphocytes (4.3 mM) (19) and other human cell lines such as H9 cells, macrophages, and unstimulated CD4(+) or CD8(+) T cells (1.3-2.2

mM) (20). For each ionic condition, we determined the initial velocity (V_i) of reverse transcription. For homopolymeric templates, V_i is directly proportional to the incorporation rate of a single nucleotide.

In the absence of ATP, V_i was maximum at 1 mM MgCl₂, smoothly decreased as the Mg²⁺ concentration increased up to 10 mM, and abruptly decreased below 1 mM MgCl₂ (Fig. 1). As the stability of RT/nucleic acid complexes is highly sensitive to salts (29), we suggest that the polymerase activity decrease above 1 mM MgCl₂ is due to faster dissociation of the enzyme as the ionic strength increases. Previous studies with HIV-1 RT and homopolymeric RNA also reported smooth variations of the polymerase activity between 1 and 10 mM Mg²⁺, but the RT activity was usually optimum at ~5 mM MgCl₂ (13, 14, 16). However, most of these studies were performed at lower salt concentration than our experiments. Thus, higher MgCl₂ concentration was likely required to dissociate the RT/nucleic acid complexes. In addition, in this studies HIV-1 RT was purified from viral particles, and these protein samples probably contained Ca²⁺ traces (13). Low concentrations of this cation strongly inhibit HIV-1 RT and shift the apparent Mg²⁺ dependency of the polymerase activity to higher concentration (30). Using recombinant HIV-1 RT, Tan *et al.* showed that the optimal MgCl₂ concentration for polymerase activity was 1-2 mM in the absence of Ca²⁺ and 8-12 mM in the presence of ~50 μM Ca²⁺ (30), in good agreement with our results.

The sharp polymerase activity decrease below 1 mM MgCl₂ is most likely directly linked to binding of the Mg²⁺ ions in the catalytic site. The RT polymerase site contains two Mg²⁺ ions when bound to a DNA duplex in the presence of an incoming nucleotide (6). One of the Mg²⁺ ions (MgB) is bound to the three phosphate groups of the incoming dNTP and to catalytic D110 and D185 (6). This ion is brought into the catalytic site by the incoming nucleotide, and its tight binding likely prevents significant exchange with free NTP and dNTP. The second ion (MgA) binds the three catalytic Asp residues and the γ phosphate of the incoming dNTP. This catalytic ion is not bound in the RT polymerase site in the absence of the incoming dNTP (31, 32), and a recent study on HIV-1 RT indicated that its association constant is in the millimolar range (1.5 mM) (23). Thus, millimolar concentrations of Mg²⁺

ions are required to saturate the RT polymerase site, in agreement with our experimental data.

When we studied reverse transcription of poly(rA) in the presence of 3.5 mM ATP, V_i smoothly decreased between 3 and 7 mM MgCl₂ and sharply dropped below 3 mM (Fig. 1). Thus, addition of 3.5 mM ATP shifted the optimal MgCl₂ concentration from 1 to 3 mM, strongly suggesting that ATP is able to compete with the RT polymerase site for binding of Mg²⁺ ions. Indeed, the affinity of Mg²⁺ is at least one order of magnitude greater for ATP ($K_a = 10^{4.05} \text{ M}^{-1}$) than for the RT polymerase site ($K_a = 10^{2.82} \text{ M}^{-1}$, see above). In addition, the polymerase activity was systematically lower in the presence of ATP, suggesting that due to its large excess, this nucleotide might compete with dTTP for the RT catalytic site.

Influence of Mg²⁺ on (-) strand strong stop DNA synthesis

To study the effects of the Mg²⁺ concentration on reverse transcription of a natural template, we used an RNA encompassing nucleotides 1 to 311 of HIV-1 genomic RNA (MAL isolate), and followed synthesis of (-) strand strong stop DNA (ssDNA) from a DNA primer bound to the primer binding site (PBS). Reverse transcription was performed at MgCl₂ concentrations ranging from 1 to 6 mM, in the absence and in the presence of 3.5 mM ATP. Given the stability of the Mg²⁺/ATP complex ($K_a = 10^{4.05} \text{ M}^{-1}$), we calculated that in the presence of 3.5 mM ATP, the concentration of free Mg²⁺ ions ranged from 0.02 to 2.6 mM (Table 1).

In the absence of ATP, synthesis of ssDNA was most efficient at 1 mM MgCl₂, gradually decreased as the MgCl₂ concentration increased, and reached a plateau at 4-6 mM MgCl₂ (Table 1). Remarkably, ssDNA synthesis was strongly improved in the presence of 3.5 mM ATP (Table 1). Importantly, similar ssDNA levels were obtained at comparable concentrations of free Mg²⁺ ions (e.g. at 2 mM MgCl₂ without ATP and 6 mM MgCl₂ with ATP, or at 1 mM MgCl₂ without ATP and 4 mM MgCl₂ with ATP, see Table 1), strongly suggesting that the effect of ATP was due to chelation of Mg²⁺. Surprisingly, synthesis of ssDNA was optimal at 0.1 mM free Mg²⁺ and was still very efficient at 20 μM free Mg²⁺ (Table 1), in contrast with the polymerase activity measured on poly(rA) (Fig. 1). Similar results were obtained with AZT-resistant RT (bearing mutations D67N, K70R, T215F, and

K219Q) and 3TC-resistant RT (bearing mutation M184V) (data not shown).

To confirm that the effect of ATP was due to chelation of Mg²⁺ ions, we substituted EDTA, EGTA, or AMP for ATP (Table 2). At pH8, EDTA binds Mg²⁺ ions ~200 fold more efficiently than ATP ($K_a = 10^{6.43}$), whereas EGTA is a poorer Mg²⁺ ligand ($K_a = 10^{2.84}$), and AMP does not significantly bind Mg²⁺ ions ($K_a = 10^{1.8}$). At 6 mM MgCl₂, ATP, EGTA, and EDTA significantly increased ssDNA synthesis, while AMP did not, in agreement with their chelating capacities (Table 2). At 2 mM MgCl₂, EGTA increased ssDNA synthesis, but to a lower extent compared to ATP (Table 2), in agreement with our previous observation that ssDNA synthesis was optimal at ~0.1 mM free Mg²⁺ (Table 1). On the other hand, no ssDNA synthesis was observed with EDTA, suggesting that the very low concentration of free Mg²⁺ ions was not sufficient to catalyze incorporation of dNTPs (Table 1). Accordingly, only very short DNA products were observed under these conditions (not shown). Finally, AMP had very little influence on ssDNA synthesis. Taken together, these results indicate that the effect of ATP on ssDNA synthesis is mainly due to chelation of Mg²⁺ ions.

Looking at both the plateau and kinetics of ssDNA synthesis at various MgCl₂ and ATP concentrations, we observed that the free Mg²⁺ concentration had little effect on the rate of ssDNA synthesis: in all cases, ssDNA reached a plateau after ~12 min (Fig. 2). However, the free Mg²⁺ concentration strongly affected the value of this plateau (Fig. 2 and Table 1), suggesting that the RNA structure, rather than the intrinsic catalytic efficiency of RT, influenced ssDNA synthesis. Indeed, unlike poly(rA) and other homopolymeric RNAs, the 5' region of HIV-1 genomic RNA fold into several stem-loop structures whose stability is Mg²⁺-dependent (33, 34).

Influence of Mg²⁺ on formation of dead-end reverse transcription products

During ssDNA synthesis, several strong bands corresponding to intermediate products appear between the primer and the full-length ssDNA (Fig. 3). Analysis of the reverse transcription products indicated that ATP enhanced reverse transcription of HIV-1 RNA mainly by preventing accumulation of these intermediate bands (Fig. 3A). At least two classes of intermediates products can be distinguished. The first class includes the bands

(indicated by open stars in Fig. 3) that decreased over time, even in the absence of ATP: these are “true” intermediate products. They were most likely due to a transient block of RT by stable RNA structures that were ultimately unfolded and reverse transcribed, as previously observed (35-38). Expectedly, pausing at these positions decreased when the RNA structure was destabilized by lowering the free Mg²⁺ concentration (Fig. 3A).

The second class includes very strong bands (some of which are indicated by black stars in Fig. 3A) that did not decrease with increasing reaction times, indicating that they correspond to abortive (dead-end) products. Interestingly, the amount of some of these dead-end products (indicated by black stars in Fig. 3A), but not all, strongly decreased in the presence of ATP, especially at low MgCl₂ concentration. A possibility is that, at these positions, the RNA template was rapidly cut during a polymerization arrest and dissociated from the elongating DNA strand before RT could pass through the stop. A low free Mg²⁺ concentration could destabilize the RNA structure, thus preventing the polymerase block, or/and decrease the intrinsic RNase H activity (Fig. 3A, right panel).

RNase H activity and ssDNA synthesis

To test whether accumulation of dead-end products required RNase H activity, we used E478Q RNase H(-) RT. At 2 mM MgCl₂, almost no dead-end product was apparent with this mutant polymerase, irrespective of the presence of ATP (Fig. 3B). As a result, ssDNA synthesis by RNase H(-) RT only slightly increased, from 46% to 49%, upon ATP addition, and was more efficient than with wt RT (compare with Table 1). However, transient intermediate products were still observed in the absence of ATP (Fig. 3B, open stars), confirming that transient and dead-end products have different origins. The latter ones requiring RNase H activity (Fig. 3B), we suggest they are generated by rapid cleavage of the RNA template during a polymerization arrest, as observed by others (39). Cleaved RNA dissociates from the elongating DNA strand before RT can pass through the stop. A low free Mg²⁺ concentration might prevent the polymerase block by destabilizing the RNA structure or/and decrease the intrinsic RNase H activity.

To evaluate this hypothesis, we directly tested the influence of the MgCl₂

concentration and ATP on the RNase H activity of HIV-1 RT. Two modes of RNase H cleavage have been described: a polymerase-dependent cleavage (40), directed by the 3'-end of the DNA strand, and a polymerase-independent mechanism guided by the 5'-end of the RNA template (41). As the first mode of cleavage is thought to occur in concert with DNA polymerization to degrade the genomic RNA during (-) strand DNA synthesis, while the second may contribute to the degradation of larger genomic RNA fragments left after DNA 3'-end directed cleavage, we focussed on the polymerase-dependent RNase H activity. During polymerase-dependent cleavage, the RT polymerase active site is positioned at the recessed 3'-end of the DNA strand (Fig. 4A). The RNase H active site is positioned approximately 17 nts from the polymerase active site, and its position from the 3'-end of the DNA determines the position of the primary cleavage. RT then repositions and makes a secondary cleavage 7-9 nts from the recessed 3' end of the DNA (Fig. 4A).

We first tested polymerase-dependent cleavage using RNA1-47 as viral RNA and ODN35 as DNA. In this assay, the RNase H substrate is a 35-mer RNA/DNA duplex with a 12 nt RNA overhang that has no predicted secondary structure. This assay is performed in the absence of dNTP, so that the structure of the substrate cannot be affected by polymerization. Thus, this assay reflects the influence of the MgCl₂ concentration on the intrinsic RNase H catalytic activity. The MgCl₂ concentration was varied from 1 to 6 mM, with and without 3.5 mM ATP. Under these conditions, cleavage of RNA1-47 followed first-order kinetics (not shown). In the absence of ATP, the RNase H rate constant smoothly increased from 0.86 to 1.43 min⁻¹ when the MgCl₂ concentration decreased from 6 to 2 mM, and it slightly decreased (to 1.23 min⁻¹) when the MgCl₂ concentration was further reduced to 1 mM (Fig.

4B). Surprisingly, the RNase H rate constant followed the same trend in the presence of 3.5 mM ATP, and addition of ATP in the presence of 1 or 2 mM MgCl₂ had no significant effect on the intrinsic RNase H catalytic activity (Fig. 4B), in sharp contrast with the polymerization rate constant (Fig. 1). The most plausible explanation to the fact that ATP does not affect the RNase H activity is that the RNase H active site has a much higher affinity for Mg²⁺ ions than ATP, in agreement with recent crystallographic studies of a bacterial RNase H in the presence of a DNA/RNA substrate (12).

During ssDNA synthesis, MgCl₂ and ATP might also indirectly affect RNase H by modifying the stability of the RNA template and/or by affecting its refolding during DNA synthesis (38, 39). Therefore, we directly followed degradation of RNA1-311 during ssDNA synthesis by using a 5-labeled template (Fig. 4C). At 2 mM MgCl₂ and in the absence of ATP, two types of cleavage products were observed. The first category are transient products that appeared early in the kinetics and partially or totally disappeared as DNA synthesis proceeded (Fig. 4C, open stars). Further processing of these products during DNA polymerization proves that the RNA template did not dissociate from the growing DNA chain at these positions. A second class of RNA fragments did not disappear or even accumulated during DNA synthesis (Fig. 4C, black stars). At these positions, the cleaved RNA template might eventually dissociate from the nascent DNA chain, generating dead-end DNA products, as hypothesized above. Interestingly, cleavage of RNA1-311 was strongly reduced upon addition of ATP, and the products that accumulated in the absence of ATP almost completely disappeared, with the noticeable exception of the shortest (Fig. 4C). Since the intrinsic RNase activity is unaffected by ATP at 2 mM MgCl₂ (Fig. 4B), the inhibition of RNase H cleavage during ssDNA synthesis is most likely due to the influence of the free Mg²⁺ ion concentration on the RNA stability, structure, and/or refolding.

Taken together, our data explain how reverse transcription of RNA1-311 increases at low concentration of free Mg²⁺ ions (Fig. 2 and 3, Tables 1 and 2) despite a strongly reduced

intrinsic polymerase activity (Fig. 1): low Mg²⁺ concentrations affect the RNA stability that indirectly decreases degradation of the RNA template by the RNase H activity (Fig. 4), thus preventing premature dissociation of the template and primer strands that otherwise generates dead-end DNA products (Fig. 3A). This model is supported by the observation that dead-end products are not generated by an RNase H(-) RT (Fig. 3B).

The structural motifs present in RNA1-311 are found in the 5' region of HIV-1 genomic RNA, and those located in R are most likely also present in the 3' region of this RNA. Stable RNA secondary structures have also been identified in several coding regions of HIV-1 RNA including *gag* (33, 42), *pol* (43, 44), and *env* (35, 45-47). Thus, reverse transcription of not only the 5'UTR, but of the complete HIV-1 genomic RNA is likely to be strongly affected by variations in the free Mg²⁺ ion concentration.

Inhibition of ssDNA synthesis by NRTIs

In order to test the influence of the free Mg²⁺ ion concentration on the inhibition of reverse transcription by NRTIs, we compared ssDNA synthesis in the presence of the triphosphate form of FDA-approved NRTIs (3TCTP, AZTTP, ddATP the active metabolite of ddI, ddCTP, and d4TTP), in the absence or presence of 3.5 mM ATP. These NRTIs compete with natural dNTPs, are incorporated into elongating DNA by HIV-1 RT, and induce chain termination because they lack a 3' hydroxyl group (for reviews, see references 2, 3, 22).

At 6 mM MgCl₂, ssDNA synthesis was inhibited by ≥ 85 % with all NRTIs, except 3TCTP, which was slightly less efficient (54 % inhibition) (Table 2), in agreement with its slow incorporation rate (48). The efficiency of these NRTIs slightly decreased in the presence of 2 mM MgCl₂ or 6 mM MgCl₂ and 3.5 mM ATP (Table 2). Remarkably, the NRTI efficiency was dramatically reduced in the presence of 2 mM MgCl₂ and 3.5 mM ATP (Table 2 and Fig. 5). At 2 mM MgCl₂ and 3.5 mM ATP, ddATP, ddCTP, 3TCTP, and d4TTP reduced ssDNA synthesis only by 15 to 38 %, while AZTTP remained more efficient (62 % inhibition). In all cases, more ssDNA was synthesized in the presence of NRTIs at 2 mM MgCl₂ and 3.5 mM ATP than in the absence of inhibitor at 6 mM MgCl₂ (Table 2). This was

also true when RNase H(-) RT was substituted for wt RT, even though the mutant polymerase was more sensitive to NRTIs at all Mg²⁺ concentrations tested (Table 2). This indicates that the effect of ATP on RT discrimination against NRTIs is not due to an indirect effect on RNase H activity.

Kinetics of inhibition of ssDNA synthesis by NRTIs showed that the intensity of the bands corresponding to NRTI-terminated DNA molecules did not vary over time, indicating that once incorporated in the DNA chain, wt RT did not excise the nucleoside analogues by a PPi or ATP-dependent mechanism (for reviews, see references 24, 26) (Fig. 5 and left panel of Fig. 6A). However, the intensity of the NRTI-terminated products strongly decreased with decreasing free Mg²⁺ concentration, and totally disappeared in the case of 3TCTP. These results indicate that HIV-1 RT discriminates more efficiently against 3'-deoxynucleoside analogues at low free Mg²⁺ concentration and are in line with a recent study by Deval et al. (23) showing that the K_m of Mg²⁺ for incorporation of AZTTP and d4TTP is fourfold higher than for dTTP. They indicate that the *in vivo* potency of NRTIs might be dramatically lower than deduced from *in vitro* assays performed at high Mg²⁺ concentration, due to the low free Mg²⁺ concentration in several cell types, fluids and organs infected by HIV-1 (17-19).

The increased discrimination against NRTIs at low Mg²⁺ concentration is not trivial to explain, as the two Mg²⁺ ions of the RT polymerase site interact with the phosphate groups of the incoming dNTP, but not with its 3'-hydroxyl group (6) (Fig. 7). Thus, dNTPs and NRTIs probably bind Mg²⁺ with similar strength. The crystal structure of RT with a bound primer/template and an incoming dNTP showed that the deoxyribose and phosphate parts of the dNTP are maintained by three networks of interactions : i) the 3' hydroxyl group of the dNTP projects into a small pocket lined by the side chains of D113, Y115, F116, and Q151 (Fig. 7, in blue) and the main-chain between 113 and 115 (Fig. 7, blue and purple). It may also form an intramolecular H-bond with the pro-S_p oxygen of the α phosphate. ii) The convex face of the triphosphate moiety is coordinated by the side chains of K65 (with the α phosphate) and R72 (with the β phosphate) (Fig. 7, in yellow), and the main-chain of residues 113 and 114 (Fig. 7, purple). iii) On the concave face, a non bridging oxygen from each of

the phosphate interacts with one Mg²⁺ ion, while the γ phosphate also interacts with the other Mg²⁺ ion (Fig. 7, in yellow) (6). Our data, together with previous studies, suggest that one of the interaction sets can be perturbed without drastic effects: i) wt RT efficiently incorporates 2',3'-dideoxynucleotides (ddNTP, including NRTIs) (49), ii) mutation K65R has minimal effects on the incorporation of natural dNTPs (50), iii) RT is active at very low Mg²⁺ concentration (our results). However, simultaneously perturbing two interaction networks dramatically reduces activity: ddNTPs are not efficiently incorporated by K69R RT, which is thus resistant to several NRTIs (50), or by wt RT at low free Mg²⁺ concentration (our results). It seems that this activity decrease is due to a perturbation of the ddNTP conformation that affects the catalytic step, rather than reduced ddNTP binding (50).

Primer unblocking by AZT-resistant RT

Resistance to NRTIs involves two main mechanisms: increased discrimination against the inhibitor, and primer unblocking by excision of the NRTI after its incorporation in the growing DNA chain (24, 26). Excision is the main resistance mechanism against AZT and can also concern most other NRTIs, depending of the resistance mutations that are selected during viral replication (26). Prolonged treatments with AZT select for resistance mutations that allow excision of the incorporated AZTMP by using ATP as a pyrophosphate donor (for reviews, see references 24, 26). To study of the free Mg²⁺ concentration on the excision reaction, we compared the inhibition of ssDNA synthesis by AZTTP using either wt or an AZT-resistant RT bearing mutations D67N, K70R, T215F and K219Q at constant ATP (3.5 mM) and varying MgCl₂ concentrations (Fig. 6). In the presence of 4 μ M AZTTP, wt RT extended 3.2 and 9.5 % of the primer into ssDNA at 6 and 2 mM MgCl₂, respectively, while ssDNA amounted to 6.4 and 18.9 % at 6 and 2 mM MgCl₂, respectively, with AZT-resistant RT (Fig. 6A).

As shown by PAGE, the intensity of the bands corresponding to AZTMP-terminated products did not vary over time with wt RT, while the intensity of some of these bands decreased at increasing reaction times with AZT-resistant RT, thus confirming that resistant RT, unlike wt RT, excised AZTMP at some specific positions (Fig. 6A). Quantification of the

time-course evolution of six representative AZT-terminated products showed that the excision efficiency greatly varied from one AZT incorporation site to the other (Fig. 6B): it varied from $\leq 5\%$ to $> 60\%$ unblocking after one hour. However, this process was always more efficient at 2 mM than at 6 mM MgCl₂ (Fig. 6B). This was unexpected since, *in vivo*, the excision mechanism most likely requires binding of ATP, or more precisely Mg(II)_ATP, into the RT polymerase active site (51, 52). In the case of AZTTP incorporation sites 3 to 6, we were able to show that the AZTMP excision followed first order kinetics and to determine the excision rate constants. The AZTMP excision rate constant increased by 1.42 (site 5) to 4.15 (site 6) fold as the MgCl₂ concentration decreased from 6 to 2 mM (not shown). Thus, the influence of the MgCl₂ concentration on AZTMP excision is position dependent, suggesting a sequence-dependent or structure-dependent effect. Interestingly, NRTI excision was recently shown to be enhanced when the RNase H activity is diminished (53). It was proposed that after RNase H cleavage, the DNA growing strand dissociates from the template, thereby preventing AZTMP excision. In our case, increased excision might be the result of decreased RNase H activity at low free Mg²⁺ concentration, as observed in Fig. 4C, which would provide more time for the ATP-lysis to take place before DNA dissociates from the degraded RNA template. Thus, reduced accumulation of dead-end products and enhanced AZTMP excision during ssDNA synthesis at low Mg²⁺ concentration probably have the same origin.

Concluding Remarks

The Mg²⁺ concentrations in human lymphocytes (19), in blood (18), and in the brain (17) are much lower than those usually used in *in vitro* RT studies. Lymphocytes are one of the main HIV-1 targets, and reverse transcription already starts in biological fluids, inside the viral particles (54). In addition, HIV-1 often infects the brain (55). Therefore, it was important to evaluate the influence of the Mg²⁺ concentration on reverse transcription. Here, we systematically studied the effects of the Mg²⁺ concentration on the polymerase and RNase H activities of HIV-1 RT on synthetic and natural RNA templates, on the inhibition of

reverse transcription by NRTIs, and on resistance to these drugs by primer unblocking. In order to mimic the cellular situation as closely as possible, we not only varied the MgCl₂ concentration, but also included a physiological ATP concentration in some of our experiments. Indeed, ATP and other cellular magnesium binders (NTP, dNTP, DNA, RNA) likely compete with RT for Mg²⁺ ions *in vivo*.

Our study demonstrated multiple influences of the free Mg²⁺ ion concentration on reverse transcription of a natural RNA template, its inhibition by NRTIs and excision of AZT-MP after its incorporation in the DNA strand. The effects on the efficiency of reverse transcription and on resistance to AZT are most likely indirect and result from the influence of the free Mg²⁺ ion concentration on the RNase H activity, which is itself indirectly due to the influence of Mg²⁺ ions on the RNA structure. On the contrary, the Mg²⁺ concentration directly affects the discrimination between natural dNTPs and NRTIs. Thus, our study indicates that the free Mg²⁺ concentration is a crucial parameter to take into account when studying reverse transcription, its inhibition by NRTIs, or the resistance mechanisms. It also stresses the importance of mimicking the natural situation as closely as possible, since the influence of the MgCl₂ and ATP concentrations on ssDNA synthesis could not be anticipated from their effects on polymerase and RNase H activities in model systems.

Finally, the intracellular free Mg²⁺ concentration might vary considerably between different cell types or during the cell cycle, as a result of variations in the NTP and messenger RNA pools, for instance. These fluctuations might strongly affect HIV-1 replication and its inhibition, and might play a role in the establishment of HIV-1 reservoirs.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the “Agence Nationale de Recherches sur le SIDA” (ANRS) to C.E. and R.M.

References

1. Arts, E.J. and Le Grice, S.F. (1998) Interaction of retroviral reverse transcriptase with template-primer duplexes during replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 339-393.
2. De Clercq, E. (2004) Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* **2**, 704-720.
3. Gotte, M. (2004) Inhibition of HIV-1 reverse transcription: basic principles of drug action and resistance *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2**, 707-716.
4. Locatelli, G.A., Cancio, R., Spadari, S. and Maga, G. (2004) HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: current issues and future perspectives. *Curr Drug Metab* **5**, 283-290.
5. Gilboa, E., Mitra, S.W., Goff, S. and Baltimore, D. (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* **18**, 93-100.
6. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance *Science* **282**, 1669-1675.
7. Kaushik, N., Rege, N., Yadav, P.N., Sarafianos, S.G., Modak, M.J. and Pandey, V.N. (1996) Biochemical analysis of catalytically crucial aspartate mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **35**, 11536-11546.
8. Patel, H.P., Jacobo-Molina, A., Ding, J., Tantillo, C., Clark, A.D.J., Raag, R., Nanni, R.G., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1995) Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase *Biochemistry* **34**, 5351-5363.
9. Cirino, N.M., Cameron, C.E., Smith, J.S., Rausch, J.W., Roth, M.J., Benkovic, S.J. and Le Grice, S.F. (1995) Divalent cation modulation of the ribonuclease functions of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**, 9936-9943.
10. Klumpp, K., Hang, J.Q., Rajendran, S., Yang, Y., Derosier, A., Wong Kai In, P., Overton, H., Parkes, K.E., Cammack, N. and Martin, J.A. (2003) Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6852-6859.
11. Davies, J.F., 2nd, Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S.R. and Matthews, D.A. (1991) Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**, 88-95.

12. Nowotny, M., Gaidamakov, S.A., Crouch, R.J. and Yang, W. (2005) Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis. *Cell* **121**, 1005-1016.
13. Hoffman, A.D., Banapour, B. and Levy, J.A. (1985) Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology* **147**, 326-335.
14. Rey, M.A., Spire, B., Dormont, D., Barre-Sinoussi, F., Montagnier, L. and Chermann, J.C. (1984) Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T-lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 126-133.
15. Starnes, M.C. and Cheng, Y.C. (1989) Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 7073-7077.
16. Wondrak, E.M., Lower, J. and Kurth, R. (1986) Functional purification and enzymic characterization of the RNA-dependent DNA polymerase of human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 2791-2797.
17. Gee, J.B.I.I., Corbett, R.J.T., Perlman, J.M. and Lupton, A.R. (2001) Hypermagnesemia does not increase brain intracellular magnesium in newborn swine *Pediatr. Neurol.* **25**, 304-308.
18. Wang, S., McDonnell, E.H., Sedor, F.A. and Toffaletti, J.G. (2002) pH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood *Arch. Pathol. Lab. Med.* **126**, 947-950.
19. Delva, P., Pastori, C., Degan, M., Montesi, G. and Lechi, A. (2004) Catecholamine-induced regulation in vitro and ex vivo of intralymphocyte ionized magnesium. *J. Membr. Biol.* **199**, 163-171.
20. Smith, A.J., Meyer, P.R., Asthana, D., Ashman, M.R. and Scott, W.A. (2005) Intracellular substrates for the primer-unblocking reaction by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: detection and quantitation in extracts from quiescent- and activated-lymphocyte subpopulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1761-1769.
21. Gallant, J.E., Gerondelis, P.Z., Wainberg, M.A., Shulman, N.S., Haubrich, R.H., St Clair, M., Lanier, E.R., Hellmann, N.S. and Richman, D.D. (2003) Nucleoside and nucleotide

analogue reverse transcriptase inhibitors: a clinical review of antiretroviral resistance. *Antivir Ther* **8**, 489-506.

22. Sharma, P.L., Nurpeisov, V., Hernandez-Santiago, B., Beltran, T. and Schinazi, R.F. (2004) Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Curr Top Med Chem* **4**, 895-919.

23. Deval, J., Alvarez, K., Selmi, B., Bermond, M., Boretto, J., Guerreiro, C., Mulard, L. and Canard, B. (2005) Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using alpha-boranophosphate nucleoside analogs. *J. Biol. Chem.* **280**, 3838-3846.

24. Deval, J., Courcambeck, J., Selmi, B., Boretto, J. and Canard, B. (2004) Structural determinants and molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues *Curr Drug Metab* **5**, 305-316.

25. Sluis-Cremer, N., Arion, D. and Parniak, M.A. (2000) Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) *Cell Mol Life Sci* **57**, 1408-1422.

26. Goldschmidt, V. and Marquet, R. (2004) Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 1687-1705.

27. Marquet, R., Baudin, F., Gabus, C., Darlix, J.L., Mougel, M., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1991) Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2349-2357.

28. Le Grice, S.F., Cameron, C.E. and Benkovic, S.J. (1995) Purification and characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Methods Enzymol.* **262**, 130-144.

29. Cristofaro, J.V., Rausch, J.W., Le Grice, S.F. and DeStefano, J.J. (2002) Mutations in the ribonuclease H active site of HIV-RT reveal a role for this site in stabilizing enzyme-primer-template binding. *Biochemistry* **41**, 10968-10975.

30. Tan, C.K., Zhang, J., Li, Z.Y., Tarpley, W.G., Downey, K.M. and So, A.G. (1991) Functional characterization of RNA-dependent DNA polymerase and RNase H activities of a recombinant HIV reverse transcriptase. *Biochemistry* **30**, 2651-2655.

31. Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S.G., Clark, A.D.J., Jacobo-Molina, A., Tantillo, C., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1998) Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 1095-1111.
32. Ding, J., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1997) Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* **44**, 125-138.
33. Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J.L., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1993) Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J. Mol. Biol.* **229**, 382-397.
34. Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2004) First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J. Biol. Chem.* **279**, 48397-48403.
35. Driscoll, M.D., Golinelli, M.P. and Hughes, S.H. (2001) In vitro analysis of human immunodeficiency virus type 1 minus-strand strong-stop DNA synthesis and genomic RNA processing. *J Virol* **75**, 672-686.
36. Lanciault, C. and Champoux, J.J. (2005) Effects of unpaired nucleotides within HIV-1 genomic secondary structures on pausing and strand transfer. *J. Biol. Chem.* **280**, 2413-2423.
37. Suo, Z. and Johnson, K.A. (1997) Effect of RNA secondary structure on the kinetics of DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **36**, 12459-12467.
38. Suo, Z. and Johnson, K.A. (1997) RNA secondary structure switching during DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **36**, 14778-14785.
39. Suo, Z. and Johnson, K.A. (1997) Effect of RNA secondary structure on RNA cleavage catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **36**, 12468-12476.
40. Gopalakrishnan, V., Peliska, J.A. and Benkovic, S.J. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10763-10767.
41. Wisniewski, M., Balakrishnan, M., Palaniappan, C., Fay, P.J. and Bambara, R.A. (2000) Unique progressive cleavage mechanism of HIV reverse transcriptase RNase H. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **97**, 11978-11983.

42. Paillart, J.C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (2002) In vitro evidence for a long range pseudoknot in the 5'-untranslated and matrix coding regions of HIV-1 genomic RNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 5995-6004.

43. Parkin, N.T., Chamorro, M. and Varmus, H.E. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* **66**, 5147-5151.

44. Staple, D.W. and Butcher, S.E. (2005) Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J. Mol. Biol.* **349**, 1011-1023.

45. Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M. and Skinner, M.A. (1990) HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685-693.

46. Ippolito, J.A. and Steitz, T.A. (2000) The structure of the HIV-1 RRE high affinity rev binding site at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **295**, 711-717.

47. Peleg, O., Brunak, S., Trifonov, E.N., Nevo, E. and Bolshoy, A. (2002) RNA secondary structure and sequence conservation in C1 region of human immunodeficiency virus type 1 env gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 867-878.

48. Krebs, R., Immendorfer, U., Thrall, S.H., Wohrl, B.M. and Goody, R.S. (1997) Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-TC. *Biochemistry* **36**, 10292-10300.

49. Dahlberg, J.E., Mitsuya, H., Blam, S.B., Broder, S. and Aaronson, S.A. (1987) Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2469-2473.

50. Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S.R., Guerreiro, C. and Canard, B. (2001) Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an alpha-boranophosphate nucleoside analogue *J. Biol. Chem.* **276**, 48466-48472.

51. Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Arnold, E. and Hughes, S.H. (2001) Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**,

4832-4842.

52. Meyer, P.R., Matsuura, S.E., Mian, A.M., So, A.G. and Scott, W.A. (1999) A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* **4**, 35-43.

53. Nikolenko, G.N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J.W., Coffin, J.M. and Pathak, V.K. (2005) Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: Balance between RNase H activity and nucleotide excision *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2093-2098.

54. Zhang, H., Dornadula, G. and Pomerantz, R.J. (1998) Natural endogenous reverse transcription of HIV-1. *J. Reprod. Immunol.* **41**, 255-260.

55. Berger, J.R. and Avison, M. (2004) The blood brain barrier in HIV infection. *Front Biosci* **9**, 2680-2685.

Legends to Figures

Figure 1: Influence of the MgCl₂ concentration on the rate of poly(rA) reverse transcription in the absence and in the presence of ATP. Poly(rA)/(dT)₁₈ (500 nM) was extended by 25 nM wt RT with 1 μM [³H]-dTTP at various MgCl₂ concentrations, with (closed squares) or without (open squares) 3.5 mM ATP. For each condition, the initial velocity (Vi) was determined as described in “Materials and Methods” and plotted versus the MgCl₂ concentration.

Figure 2: Influence of MgCl₂ and ATP on ssDNA synthesis. Kinetics of ssDNA synthesis at 2 (circles), 4 (squares), or 6 (triangles) mM MgCl₂, in the absence (open symbols) or in the presence (closed symbols) of 3.5 mM ATP.

Figure 3: Influence of MgCl₂, ATP, and RNase H activity on the accumulation of intermediate products. (A) PAGE analysis of the products generated by wt RT at 2 or 6 mM MgCl₂, in the absence or in the presence of 3.5 mM ATP. Transient (open stars) and dead-end (closed stars) intermediate products are indicated, together with the unextended primer, ssDNA, and larger products produced by self-priming of ssDNA. (B) PAGE analysis of the products generated by E478Q RNase H(-) RT 2 mM MgCl₂, in the absence or in the presence of 3.5 mM ATP. Transient intermediate products are labeled as in (A). Lanes 1 to 6 correspond to reverse transcription for 0, 1, 5, 10, 30, and 60 min.

Figure 4: Influence of MgCl₂ and ATP on RNase H activity. (A) Schematic drawing of the polymerase-dependent RNase H cleavages and of the substrate used in panel B. (B) The rate constant of RNase H cleavage of RNA1-47 in the absence (open circles) and in the presence (close circles) of 3.5 mM ATP is plotted as a function of the MgCl₂ concentration. (C) Cleavage of 5'-labeled RNA1-311 was followed during ssDNA synthesis in 2 mM MgCl₂, with or without 3.5 mM ATP. Lanes 1 to 6 correspond to reverse transcription for 0, 1, 5, 10, 30, and 60 min. Transient degradation products are marked by open stars, while those persisting or accumulating over time are indicated by black stars.

Figure 5: Influence of MgCl₂ and ATP on the inhibition of ssDNA synthesis by NRTIs. Synthesis of ssDNA was performed in the presence of 5 μM 3TCTP or d4TTP at 2 or 6 mM

MgCl₂, in the absence or in the presence of 3.5 mM ATP. The first 6 3TC- and 13 d4T-incorporation sites are marked by closed and open circles, respectively. Lanes 1 to 6 correspond to reverse transcription for 0, 1, 5, 10, 30, and 60 min .

Figure 6: Influence of MgCl₂ and ATP on primer unblocking by AZT-resistant RT. (A) ssDNA synthesis was performed in the presence of 3.5 mM ATP and 4 μM AZTTP with wt or AZT-resistant RT at 2 or 6 mM MgCl₂. Six AZT incorporation sites that are analyzed in (B) are numbered from 1 to 6 and marked by symbols. Lanes 1 to 5 correspond to reverse transcription for 0, 5, 20, 40, and 60 min. (B) Quantification of primer unblocking by AZT-resistant RT at the six incorporation sites marked in (A). The decrease of the band intensity relative to the first time point (5 min) is plotted against the reaction time.

Figure 7: Stereo view of the interactions of the incoming dNTP in the polymerase site of HIV-1 RT. Part of the crystal structure solved by (6) is shown with the primer and template residues in grey, the core of the incoming dTTP in salmon, the two Mg²⁺ ions in green, the side chains of Asp113, Tyr115, Phe116, and Gln151 in blue, the side chains of Lys65 and Arg72 in yellow, and the main chain of residues 113 and 114 (which belong to the blue and yellow sets) in purple.

Tables

Table 1: Influence of the Mg²⁺ concentration on the synthesis of (-) strand strong stop DNA

	[total Mg ²⁺] (mM)	1	2	3	4	5	6
(-) strand strong stop DNA (%) ^a	- ATP	20	17	15	13	12	12
	+ ATP	27	32	29	21	18	17
	[free Mg ²⁺] (mM) ^b	0.02	0.1	0.3	0.8	1.7	2.6

^a ([(-) strong stop DNA]/[extended + unextended primer]) x 100^b calculated concentration of free Mg²⁺ ions in the presence of 3.5 mM ATP.**Table 2:** Influence of ATP, EGTA, EDTA and AMP on the synthesis of (-) strand strong stop DNA

[MgCl ₂] (mM)		-	+ATP	+EGTA	+EDTA	+AMP
2	(-) strand strong stop DNA (%) ^a	17	29	25	0	19
	[free Mg ²⁺] (mM) ^b	2	0.1	0.7	0.0005	1.7
6	(-) strand strong stop DNA (%) ^a	11	19	18	17	11
	[free Mg ²⁺] (mM) ^b	6	2.6	3.5	2.5	5.1

^a ([(-) strong stop DNA]/[extended + unextended primer]) x 100^b calculated concentration of free Mg²⁺ ions in the presence of 3.5 mM ATP, EGTA, EDTA, or AMP**Table 3:** Influence of the Mg²⁺ concentration on the inhibition of ssDNA synthesis by NRTIs

	(-) strand strong stop DNA (%) ^a			
	6 mM Mg ²⁺	6 mM Mg ²⁺ + 3.5 mM ATP ^b	2 mM Mg ²⁺	2 mM Mg ²⁺ + 3.5 mM ATP ^c
no NRTI	12 10 ^d	17	17	34 29 ^d
ddATP	1.3 0 ^d	3.8	3.5	29 16 ^d
ddCTP	1.1	1.1	2.6	24
3TCTP	5.4	10	8.9	27
d4TTP	1.8	2.8	3.2	21
AZTTP	0.05 0 ^d	0.11	0.31	13 8 ^d

^a ([(-) strong stop DNA]/[extended + unextended primer]) x 100^b The calculated free Mg²⁺ concentration is 2.6 mM^c The calculated free Mg²⁺ concentration is 0.1 mM^d These experiments were performed with RNase H(-) RT

Figures

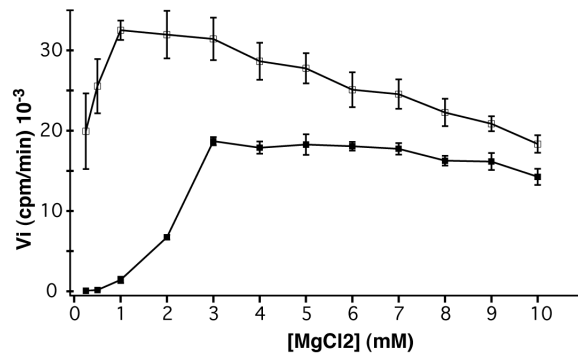


Figure 1

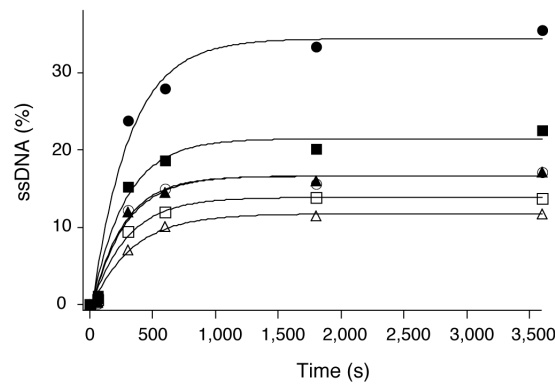


Figure 2

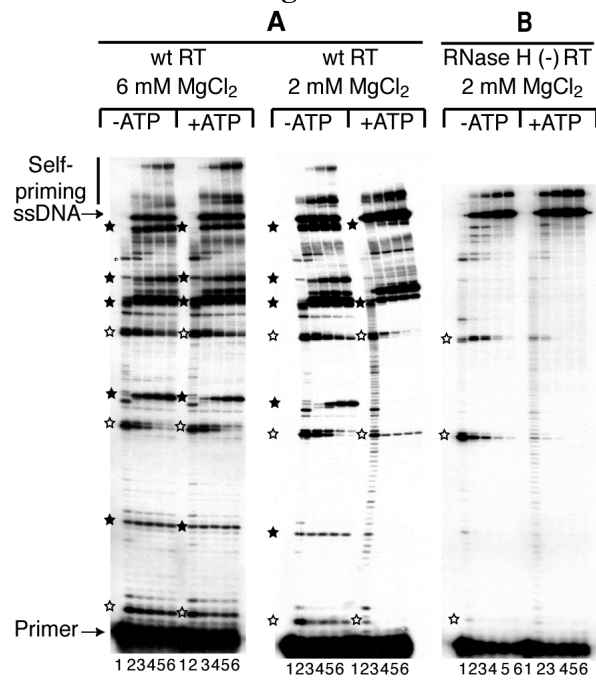


Figure 3

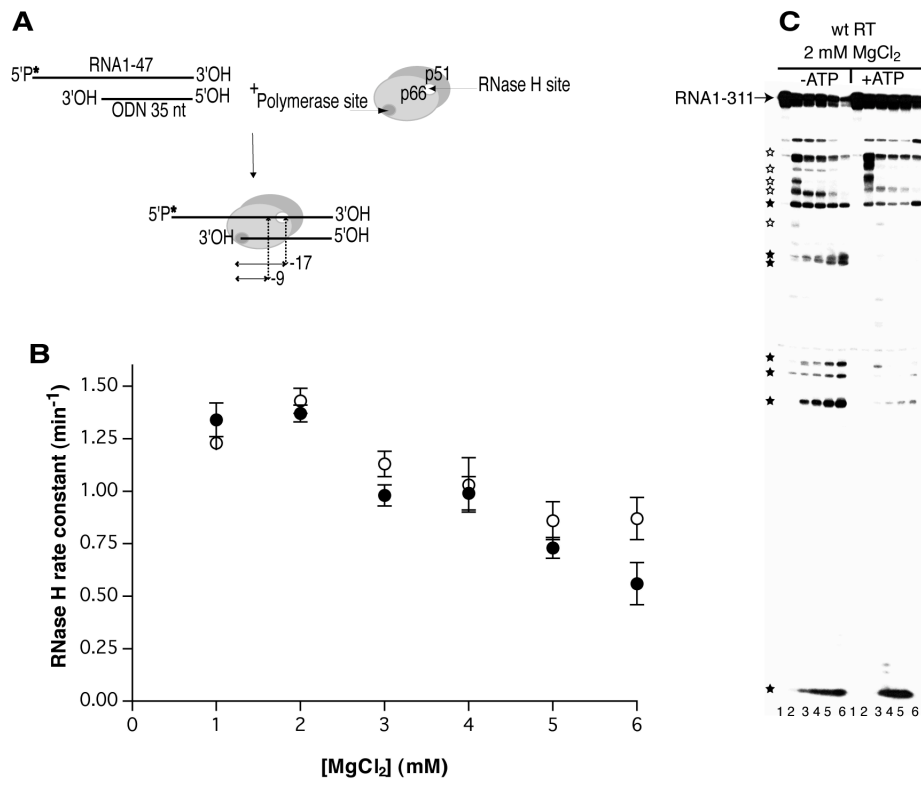


Figure 4

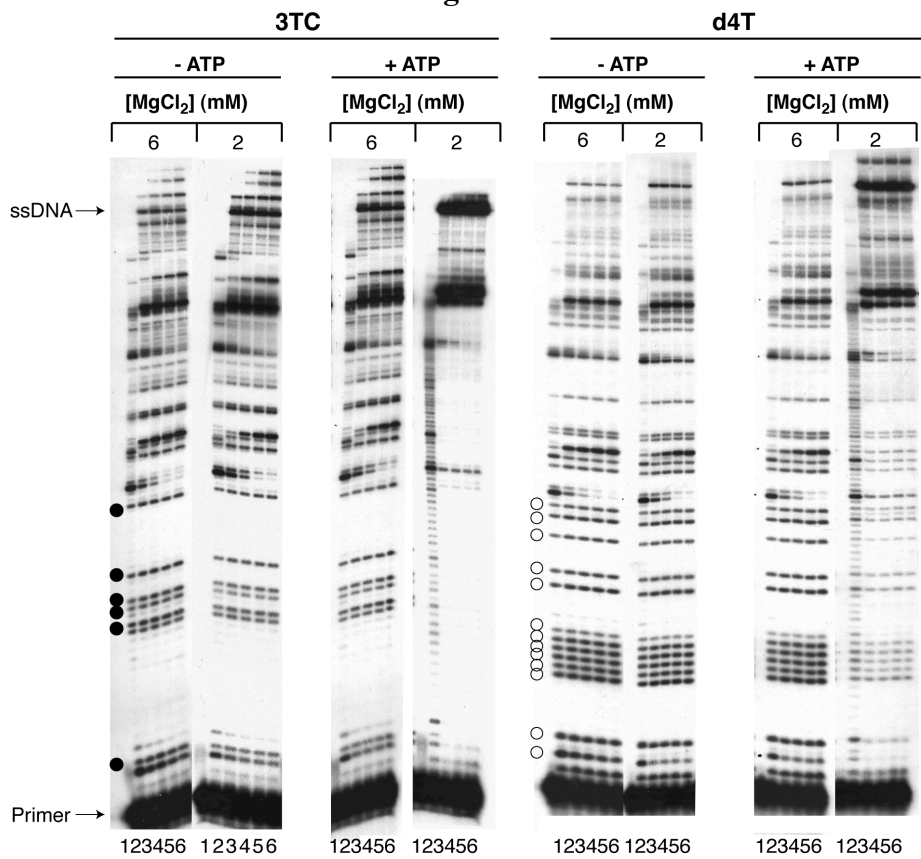


Figure 5

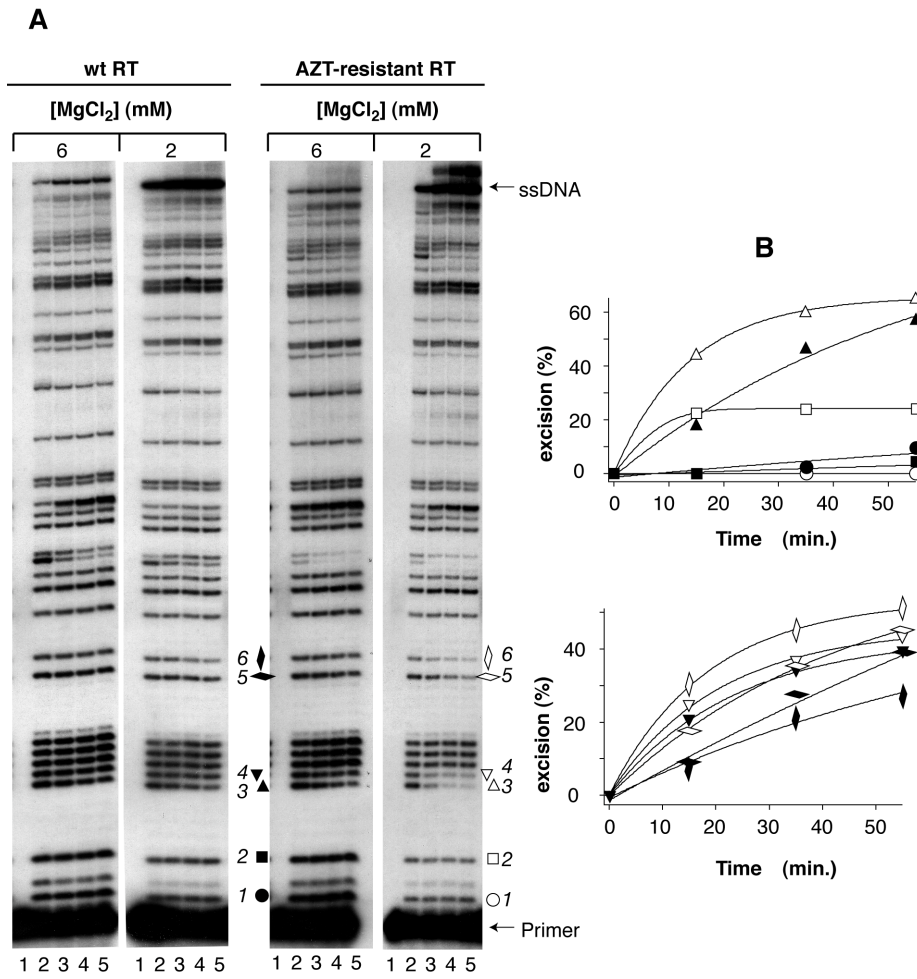


Figure 6

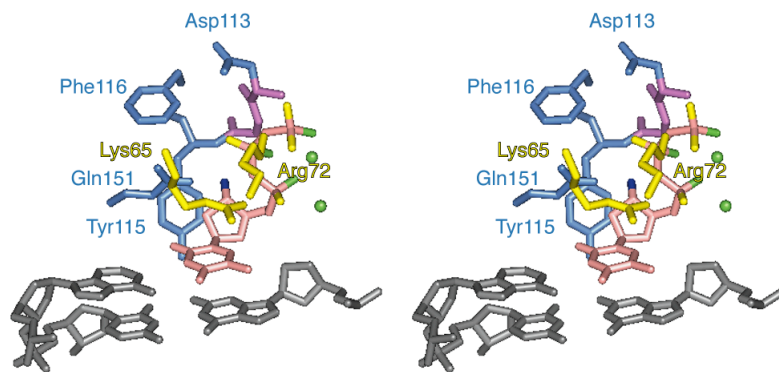


Figure 7

II. Résultats – Conclusions

En étudiant l'influence de la concentration en Mg^{2+} libre sur la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-), nous avons observé une corrélation entre la quantité d'ions Mg^{2+} libres et le taux de produit final formé. Plus la concentration en Mg^{2+} est faible, plus le taux d'ADN «strong-stop» (-) synthétisé est élevé, avec une synthèse optimale obtenue en présence de 0,1 mM de Mg^{2+} libre.

Les différences d'efficacité de rétrotranscription observées avec des matrices naturelles et synthétiques, ARN₁₋₃₁₁ et poly(rA), suggèrent que la structure de l'ARN ainsi que l'activité RNase H jouent un rôle majeur dans la dépendance au Mg^{2+} . En effet, à faible concentration en Mg^{2+} , la structure de l'ARN₁₋₃₁₁ est moins stable, la RT effectue moins de pauses, ce qui réduit le nombre de coupures RNase H sur la matrice ARN. Ainsi, les produits de rétrotranscription abortifs observés lors de synthèses à forte concentration en magnésium disparaissent et le taux d'ADN «strong-stop» (-) synthétisé est fortement augmenté.

Nous avons également montré que de faibles concentrations en Mg^{2+} réduisent l'incorporation des NRTIs dans l'ADN et augmentent l'excision par la RT^{AZTR} du NRTI incorporé dans des amorces terminées par l'AZTMP. L'inhibition de la rétrotranscription, par le ddATP, le ddCTP, le 3TCTP et le d4TTP, habituellement effectuée à 6 mM $MgCl_2$, est fortement réduite à 2 mM $MgCl_2$ en présence d'ATP, tandis que l'AZTTP montre encore une efficacité d'inhibition de l'ordre de 62%. Il semble ainsi que l'origine de la discrimination accrue des NRTIs en présence de faibles concentrations de Mg^{2+} soit due à la perturbation de la conformation des ddNTPs, qui affecte l'étape catalytique, plutôt qu'à une liaison réduite du ddNTP. Par conséquent, et en raison de la faible concentration en Mg^{2+} libre dans les différents types et fluides cellulaires, il convient de nuancer la portée des résultats d'inhibition obtenus *in vitro*, en présence de fortes concentrations en Mg^{2+} .

L'excision de l'AZTMP d'amorces-AZTMP est stimulée par de faibles concentrations de Mg^{2+} . Elle est plus ou moins accentuée en fonction des positions de rétrotranscription étudiées, ce qui suggère un effet séquence ou structure-dépendant. L'augmentation du taux d'excision proviendrait d'une réduction de l'activité RNase H à faible concentration de Mg^{2+} , ce qui permettrait à l'ATP-lyse de se produire durant un laps de temps plus important, avant que l'ADN ne se dissocie de l'ARN dégradée.

Pour conclure, nos données montrent que la rétrotranscription augmente fortement à faible concentration en Mg^{2+} , par un mécanisme dépendant de la structure de l'ARN et de l'activité RNase H. Par conséquent, la concentration en Mg^{2+} libre est un paramètre crucial à prendre en compte lors des études de rétrotranscription, d'inhibition par les NRTIs et de résistance. Ainsi, les différentes concentrations en Mg^{2+} libre de divers types cellulaires ou durant le cycle cellulaire semblent fortement affecter la réplication du VIH-1 et son inhibition.

Conclusions et perspectives

Un des objectifs de notre laboratoire est de mettre au point de nouvelles molécules anti-VIH-1, dirigées contre la RT, et dont le mode d'action diffère de celui des inhibiteurs utilisés en thérapies. Dans cette optique, nous nous sommes inspirés des résultats obtenus par l'équipe du Pr S.Piettre, qui a montré que certaines 3,7-DHT inhibent l'inositol monophosphatase humaine par chélation des deux cations catalytiques présents dans le site actif de l'enzyme (264). L'architecture des sites catalytiques polymérase et RNase H de la RT du VIH-1 (72, 153), en particulier la présence de cations divalents distants respectivement de 3,57 et 4 Å, suggère que les 3,7-DHT pourraient également inhiber la RT. En outre, cette stratégie d'inhibition par chélation est déjà développée sur l'IN du VIH-1 (130), siège des activités de processing et de transfert de brin, dont le site actif présente de fortes similitudes structurales avec le site RNase H de la RT (98, 346). De même, le BBNH (N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone) (24) et plus récemment un dikéto-acide, l'acide 4-(5-(benzoylamino)thien-2-yl)-2,4-dioxobutanoïque (301) inhibent l'activité RNase H par chélation d'ions métalliques au sein du site actif RNase H.

Nous avons ainsi étudié l'effet des 3,7-DHT sur les activités de la RT et de l'IN du VIH-1. Nous avons mis en évidence des 3,7-DHT capables d'inhiber chacune des quatre activités testées, polymérase et RNase H de la RT, de processing et de transfert de l'IN du VIH-1. Les IC_{50} des molécules les plus efficaces sur l'activité polymérase (SP2 et SP46) et de processing (SP45, SP46 et SP47) ou RNase H (SP9, SP19 et SP28) et de transfert (SP9, SP2) sont respectivement sous-micromolaires ou de l'ordre du micromolaire. Tandis que le composé SP9 ne montre aucune sélectivité, d'autres sont plus spécifiques de l'une ou l'autre activité. Les composés SP16 d'une part, SP6 et SP8 d'autre part, ou encore les composés SP acétylés sont respectivement sélectifs de l'activité de processing, de transfert et polymérase. Nous n'avons cependant pas décelé de molécule présentant une sélectivité significative à l'encontre de l'activité RNase H.

En outre, les composés modifiés en C7, SP10 et SP11, et les \square -hydroxytropolones O-méthylées SP13 et SP14 sont inactifs sur les quatre activités, ce qui suggère que les 3,7-DHT lient simultanément les deux cations catalytiques du site actif. De façon surprenante, l'acétylation des hydroxyyles O2 et O7 restreint les capacités inhibitrices des 3,7-DHT à l'activité polymérase.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette observation □ soit les composés acétylés fixent les ions Mg^{2+} uniquement dans le site polymérase, en raison d'un encombrement stérique moins important par rapport aux sites RNase H et de l'IN, soit les 3,7-DHT acétylées agissent selon un mode d'action différent. La seconde hypothèse semble moins probable car nous avons montré que l'inhibition de la synthèse de l'ADN «strong-stop» (-) est dépendante de la concentration au Mg^{2+} , à la fois pour SP15 et pour le composé acétylé SP12. Par ailleurs, nous avons également montré que ces deux composés inhibent l'activité polymérase par le même mécanisme, à savoir une inhibition réversible non compétitive vis-à-vis des dNTPs.

Ce type d'inhibition implique soit une fixation des 3,7-DHT dans le site actif polymérase n'affectant pas la fixation des dNTPs et vice-versa, soit une fixation hors du site polymérase n'impliquant par conséquent pas les cations catalytiques, à l'instar des NNRTIs. L'inhibition des RTs du VIH-2 et de MLV, dépourvues de la poche de fixation des NNRTIs, et de la RT Y181C du VIH-1, mutée dans cette même poche, nous a permis de conclure à une absence de fixation de ces molécules dans le site NNRTI. En outre, nous avons montré que les 3,7-DHT n'inhibent pas la RT *via* une dissociation de l'enzyme et ne lient pas les acides nucléiques, substrats de la RT et de l'IN du VIH-1. Enfin, une collaboration avec l'équipe du Dr M.Götte, qui a mis en évidence l'existence de deux états de translocation de la RT lors de la réaction de polymérisation (219) et figure 55), a permis de montrer que les 3,7-DHT n'inhibent pas l'étape de translocation de la RT.

Nous avons montré que l'IN, qui peut utiliser soit le Mn^{2+} ou le Mg^{2+} comme cofacteur, est plus fortement inhibée en présence de Mn^{2+} . L'implication directe des ions métalliques dans le mécanisme d'inhibition pourrait être confortée par l'étude de l'inhibition de l'IN en présence d'ions Mn^{2+} et Mg^{2+} et de composés SP comportant des groupements amino en position O2 et/ou O7. Une inhibition plus prononcée devrait être observée en présence de Mn^{2+} , en raison d'une meilleure affinité des groupements amino pour le Mn^{2+} , par rapport aux groupements hydroxyles.

L'implication des cations catalytiques dans les mécanismes d'inhibition de la RT et de l'IN par les dérivés des 3,7-DHT est fortement suggérée par nos résultats. Afin d'en obtenir une preuve directe, nous avons entrepris de cristalliser un complexe (A/M)-RT^{QC}:dNTP, en présence d'une 3,7-DHT. Des cristaux ont été obtenus de façon reproductible en présence des composés SP ou du foscarnet.

Nous avons confirmé la présence de la RT^{QC} pontée au complexe A/M, sans qu'aucun signe de protéolyse ne soit visible. Néanmoins, ces cristaux n'ont pas permis l'obtention d'un signal de diffraction aux rayons X.

Un changement d'aspect des cristaux, observé suite à l'étape de congélation, semble être la cause de l'absence d'un signal de diffraction exploitable. Nous pensons qu'il est possible d'améliorer les conditions de conservation des cristaux, en particulier par l'addition d'agents cryoprotectants comme le glycérol ou le PEG 400. Nous ne disposons néanmoins d'aucune information quant à la présence du dNTP et de l'inhibiteur dans ces cristaux. Par conséquent, il sera peut-être nécessaire d'optimiser les rapports molaires entre le complexe (A/M)-RT^{QC}, le dNTP entrant et l'inhibiteur, afin d'obtenir un complexe (A/M)-RT^{QC} au sein duquel est fixée une 3,7-DHT. Nous testerons également d'autres kits de criblage de conditions de cristallisation, auxquels il sera possible d'ajouter des agents particuliers dont des composés organiques (glycérol anhydre ...), des polyamines (spermine...), des acides (sélénate...) ou des sels (chlorure de rubidium...). La recherche de nouvelles conditions de cristallisation permettrait peut-être d'obtenir des cristaux d'empilement cristallin différent, qui diffracteraient sous une source de rayons X. Enfin, il reste possible de réaliser d'autres constructions du complexe (A/M)-RT^{QC}, en modifiant par exemple la position de la G impliquée dans le pontage ou en pontant la matrice à la RT et non plus l'amorce.

Une alternative permettant de prouver l'implication des cations catalytiques serait de déterminer le type d'inhibition de l'activité polymérase vis-à-vis de la concentration en Mg²⁺. En effet, l'obtention d'un type d'inhibition compétitif, qui implique une fixation des 3,7-DHT à la RT uniquement lorsque le Mg²⁺ y est fixé (cf. figure 44), fournirait une preuve directe d'un mécanisme d'inhibition de l'activité polymérase *via* la chélation des cations catalytiques.

L'étude du composé parent SP15, non substitué, a montré qu'il n'est jamais le composé le plus efficace quelle que soit l'activité testée et que l'environnement protéique du site de fixation est très important. Cette observation indique que l'efficacité des 3,7-DHT peut être accrue par l'addition de différents groupements sur le noyau cycloheptatriènone.

En outre, les premières indications quant à la relation structure/activité des 3,7-DHT nous ont été données par l'étude des composés monosubstitués *versus* disubstitués.

L'obtention de la structure cristallographique du complexe (A/M)-RT^{QC}:dNTP, en présence d'une 3,7-DHT, combinée à la modélisation moléculaire, devrait nous fournir de très nombreuses indications quant à la nature, l'encombrement et la position des groupements chimiques à greffer sur le noyau cycloheptatriènone afin d'obtenir des composés de seconde génération plus efficaces et spécifiques de l'une ou l'autre activité de la RT.

L'objectif de ces études de relations structure/activité, dans le cadre d'une conception rationalisée de molécules de seconde génération, est entre autres de diminuer la toxicité cellulaire des composés SP. Cette toxicité, de l'ordre du micromolaire, provient sans doute de l'inhibition d'autres enzymes bimétalliques cellulaires. Le développement des dikéto-acides constitue un exemple intéressant dans ce domaine, puisqu'ils agissent sur le transfert de brin catalysé par l'IN en chélatant un ion catalytique, mais ne montrent qu'une faible toxicité (139, 140).

Notre laboratoire s'intéresse également à deux autres stratégies d'inhibition de l'activité polymérase de la RT, l'une repose sur la mise au point d'analogues de nucléosides induisant l'arrêt de la synthèse à retardement, et l'autre sur le développement d'analogues de nucléosides hypermutagènes.

Les structures cristallographiques de la RT du VIH-1, (A/M):RT (91) et (A/M):RT:dNTP (153), révèlent que l'hélice d'ADN double brin adopte une forme de type A dans l'environnement du site polymérase. En revanche, en aval de ce site, il existe une zone de contact importante entre l'hélice \square H du pouce de la sous-unité p66 de la RT et l'ADN qui s'y présente sous la forme B (cf. figure 20). Ainsi, l'évolution de l'ADN de la forme A vers la forme B en cours de synthèse, s'accompagne d'un élargissement du petit sillon, compensé par un rétrécissement du grand sillon (91, 153). La zone de contact entre l'hélice \square H et l'ADN, essentielle à l'activité catalytique de la RT, se situe au niveau de ce petit sillon. Sur la base de ces données, V.Vivet, au sein de notre laboratoire, met au point des analogues de nucléosides capables d'être intégrés dans le brin d'ADN en cours de synthèse, mais qui ne provoquent la terminaison de l'élongation que lorsque l'analogue sera en contact avec l'hélice \square H de la RT. Cette stratégie présente l'avantage de ne pas situer l'analogue en fin de chaîne, afin d'éviter la réaction inverse de PPi-lyse et d'échange avec un NTTP.

Une seconde piste consiste à mettre au point et à synthétiser des analogues de nucléosides pouvant être incorporés par la RT, mais induisant une augmentation de la fréquence de mutation virale lors des étapes ultérieures de réplication. Il a en effet été montré qu'une augmentation de la fréquence de mutation chez les virus à ARN, même modeste, provoque un nombre d'erreur par génome suffisant pour produire des virions moins viables et moins infectieux (65, 208).

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

1. **Abd-Elazem, I. S., H. S. Chen, R. B. Bates, and R. C. Huang.** 2002. Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza*. *Antiviral Res* **55**:91-106.
2. **Akari, H., M. Fujita, S. Kao, M. A. Khan, M. Shehu-Xhilaga, A. Adachi, and K. Strebel.** 2004. High level expression of human immunodeficiency virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/nucleocapsid processing site. *J Biol Chem* **279**:12355-62.
3. **Amacker, M., and U. Hubscher.** 1998. Chimeric HIV-1 and feline immunodeficiency virus reverse transcriptases: critical role of the p51 subunit in the structural integrity of heterodimeric lentiviral DNA polymerases. *J Mol Biol* **278**:757-65.
4. **Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu, and M. F. Summers.** 2000. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* **301**:491-511.
5. **Amarasinghe, G. K., J. Zhou, M. Miskimon, K. J. Chancellor, J. A. McDonald, A. G. Matthews, R. R. Miller, M. D. Rouse, and M. F. Summers.** 2001. Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J Mol Biol* **314**:961-70.
6. **Ao, Z., X. Yao, and E. A. Cohen.** 2004. Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *J Virol* **78**:3170-7.
7. **Arion, D., N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow, and M. A. Parniak.** 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37**:15908-17.
8. **Arts, E. J., M. Ghosh, P. S. Jacques, B. Ehresmann, and S. F. Le Grice.** 1996. Restoration of tRNA³Lys-primed(-)-strand DNA synthesis to an HIV-1 reverse transcriptase mutant with extended tRNAs. Implications for retroviral replication. *J Biol Chem* **271**:9054-61.
9. **Askjaer, P., T. H. Jensen, J. Nilsson, L. Englmeier, and J. Kjems.** 1998. The

-
- specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* **273**:33414-22.
10. **Auxilien, S., G. Keith, S. F. Le Grice, and J. L. Darlix.** 1999. Role of post-transcriptional modifications of primer tRNA^{Lys,3} in the fidelity and efficacy of plus strand DNA transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **274**:4412-20.
 11. **Baba, M., M. Okamoto, M. Makino, Y. Kimura, T. Ikeuchi, T. Sakaguchi, and T. Okamoto.** 1997. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by piperazinyloxoquinoline derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1250-5.
 12. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
 13. **Basu, H. S., H. C. Schwietert, B. G. Feuerstein, and L. J. Marton.** 1990. Effects of variation in the structure of spermine on the association with DNA and the induction of DNA conformational changes. *Biochem J* **269**:329-34.
 14. **Battula, N., and L. A. Loeb.** 1976. On the fidelity of DNA replication. Lack of exodeoxyribonuclease activity and error-correcting function in avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *J Biol Chem* **251**:982-6.
 15. **Beltz, H., C. Clauss, E. Piémont, D. Ficheux, R. J. Gorelick, B. P. Roques, C. Gabus, J. L. Darlix, H. De Rocquigny, and Y. Mély.** 2005. Structural determinants of HIV-1 nucleocapsid proteins for cTAR DNA binding and destabilization, and correlation with inhibition of self-primed DNA synthesis. *J Mol Biol* **348**:1113-1126.
 16. **Beltz, H., E. Piémont, E. Schaub, D. Ficheux, B. P. Roques, J. L. Darlix, and Y. Mély.** 2004. Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol* **338**:711-723.
 17. **Berkhout, B.** 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**:1-34.
 18. **Berkhout, B., A. Gagnol, A. B. Rabson, and K. T. Jeang.** 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* **62**:757-67.
 19. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.
 20. **Bidou, L., G. Stahl, B. Grima, H. Liu, M. Cassan, and J. P. Rousset.** 1997. In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop

-
- stimulatory signal. *Rna* **3**:1153-8.
21. **Bischerour, J., H. Leh, E. Deprez, J. C. Brochon, and J. F. Mouscadet.** 2003. Disulfide-linked integrase oligomers involving C280 residues are formed in vitro and in vivo but are not essential for human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **77**:135-41.
 22. **Bizub-Bender, D., J. Kulkosky, and A. M. Skalka.** 1994. Monoclonal antibodies against HIV type 1 integrase: clues to molecular structure. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1105-15.
 23. **Bonnenfant, S., M. C. Thomas, C. Vita, F. Subra, E. Deprez, F. Zouhiri, D. Desmaele, J. d'Angelo, J. F. Mouscadet, and H. Leh.** 2004. Styrylquinolines, Integrase inhibitors acting prior to integration: a new mechanism of action for anti-integrase agents. *Journal of Virology* **78**:5728-5736.
 24. **Borkow, G., R. S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G. I. Dmitrienko, and M. A. Parniak.** 1997. Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone. *Biochemistry* **36**:3179-85.
 25. **Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, R. A. Fouchier, Y. Jenkins, B. E. Meyer, L. I. Wu, M. Emerman, and M. H. Malim.** 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* **7**:1025-35.
 26. **Boyer, P. L., A. L. Ferris, P. Clark, J. Whitmer, P. Frank, C. Tantillo, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 1994. Mutational analysis of the fingers and palm subdomains of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Mol Biol* **243**:472-83.
 27. **Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 2001. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**:4832-42.
 28. **Braaten, D., E. K. Franke, and J. Luban.** 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**:3551-60.
 29. **Braaten, D., and J. Luban.** 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *Embo J* **20**:1300-9.
 30. **Bresloff, J. L., and D. M. Crothers.** 1981. Equilibrium studies of ethidium--polynucleotide interactions. *Biochemistry* **20**:3547-53.
 31. **Brodin, P., M. Pinskaya, M. Buckle, U. Parsch, E. Romanova, J. Engels, M. Gottikh, and J. F. Mouscadet.** 2002. Disruption of HIV-1 integrase-DNA complexes by short

-
- 6-oxocytosine-containing oligonucleotides. *Biochemistry* **41**:1529-38.
32. **Brule, F., R. Marquet, L. Rong, M. A. Wainberg, B. P. Roques, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 2002. Structural and functional properties of the HIV-1 RNA-tRNA(Lys)₃ primer complex annealed by the nucleocapsid protein: comparison with the heat-annealed complex. *Rna* **8**:8-15.
 33. **Budihas, S. R., I. Gorshkova, S. Gaidamakov, A. Wamiru, M. K. Bona, M. A. Parniak, R. J. Crouch, J. B. McMahon, J. A. Beutler, and S. F. Le Grice.** 2005. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res* **33**:1249-56.
 34. **Bujacz, G., J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, M. Andrade, R. A. Katz, and A. M. Skalka.** 1997. Binding of different divalent cations to the active site of avian sarcoma virus integrase and their effects on enzymatic activity. *J Biol Chem* **272**:18161-8.
 35. **Bukrinsky, M.** 2004. A hard way to the nucleus. *Mol Med* **10**:1-5.
 36. **Bukrinsky, M. I., and O. K. Haffar.** 1998. HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr. *Mol Med* **4**:138-43.
 37. **Burnett, B. P., and C. S. McHenry.** 1997. Posttranscriptional modification of retroviral primers is required for late stages of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7210-5.
 38. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* **22**:217-27.
 39. **Canard, B., S. R. Sarfati, and C. C. Richardson.** 1998. Enhanced binding of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase to the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem* **273**:14596-604.
 40. **Carrieri, M., F. Raffi, and C. Lewden.** 2003. Impact of early versus late adherence to highly active antiretroviral therapy on immuno-virological response: a 3-year follow-up study. *Antivir Therapy* **8**:585-594.
 41. **Carroll, S. S., J. Geib, D. B. Olsen, M. Stahlhut, J. A. Shafer, and L. C. Kuo.** 1994. Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by azidothymidine triphosphate. *Biochemistry* **33**:2113-20.
 42. **Cen, S., Y. Huang, A. Khorchid, J. L. Darlix, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1999. The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA₃Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* **73**:4485-8.
 43. **Cen, S., H. Javanbakht, S. Kim, K. Shiba, R. Craven, A. Rein, K. Ewalt, P.**

-
- Schimmel, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2002. Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J Virol* **76**:13111-5.
44. **Cen, S., A. Khorchid, J. Gabor, L. Rong, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2000. Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**:10796-800.
45. **Cen, S., A. Khorchid, H. Javanbakht, J. Gabor, T. Stello, K. Shiba, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2001. Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:5043-8.
46. **Cen, S., M. Niu, and L. Kleiman.** 2004. The connection domain in reverse transcriptase facilitates the in vivo annealing of tRNA^{Lys3} to HIV-1 genomic RNA. *Retrovirology* **1**:33.
47. **Chao, S. H., K. Fujinaga, J. E. Marion, R. Taube, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, B. M. Peterlin, and D. H. Price.** 2000. Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* **275**:28345-8.
48. **Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**:2814-20.
49. **Chen, H., and A. Engelman.** 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15270-4.
50. **Chen, J. C., J. Krucinski, L. J. Miercke, J. S. Finer-Moore, A. H. Tang, A. D. Leavitt, and R. M. Stroud.** 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8233-8.
51. **Chen, R., E. Le Rouzic, J. A. Kearney, L. M. Mansky, and S. Benichou.** 2004. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* **279**:28419-25.
52. **Chen, Y., M. Balakrishnan, B. P. Roques, and R. A. Bambara.** 2005. Acceptor RNA cleavage profile supports an invasion mechanism for HIV-1 minus strand transfer. *J Biol Chem*.
53. **Chen, Y., M. Balakrishnan, B. P. Roques, and R. A. Bambara.** 2003. Steps of the acceptor invasion mechanism for HIV-1 minus strand strong stop transfer. *J Biol Chem* **278**:38368-75.
54. **Cheng, Y. C., G. E. Dutschman, K. F. Bastow, M. G. Sarngadharan, and R. Y. Ting.**

-
1987. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. *J Biol Chem* **262**:2187-9.
55. **Chiu, T. K., and D. R. Davies.** 2004. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* **4**:965-77.
56. **Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano.** 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**:183-8.
57. **Cirino, N. M., C. E. Cameron, J. S. Smith, J. W. Rausch, M. J. Roth, S. J. Benkovic, and S. F. Le Grice.** 1995. Divalent cation modulation of the ribonuclease functions of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:9936-9943.
58. **Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-5.
59. **Clever, J. L., D. A. Eckstein, and T. G. Parslow.** 1999. Genetic dissociation of the encapsidation and reverse transcription functions in the 5' R region of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**:101-9.
60. **Clever, J. L., M. L. Wong, and T. G. Parslow.** 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**:5902-8.
61. **Coffin, J. M., S. H. Hughes, and H. E. Varmus (ed.).** 1997. *Retrovirus*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
62. **Cohen, J.** 2005. Prevention cocktails: combining tools to stop HIV's spread., p. 1002-1005, *Science*, vol. 309.
63. **Colonna, R. J., A. Thiry, K. Limoli, and N. Parkin.** 2003. Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1324-33.
64. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *Embo J* **15**:5783-8.
65. **Crotty, S., C. E. Cameron, and R. Andino.** 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6895-900.
66. **D'Cruz, O. J., and F. M. Uckun.** 2004. Clinical development of microbicides for the prevention of HIV infection. *Curr Pharm Des* **10**:315-36.
67. **Daelemans, D., A. M. Vandamme, and E. De Clercq.** 1999. Human immunodeficiency

-
- virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother* **10**:1-14.
68. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
69. **Dandekar, D. H., K. N. Ganesh, and D. Mitra.** 2004. HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res* **32**:1270-8.
70. **Das, K., A. D. Clark, Jr., P. J. Lewi, J. Heeres, M. R. De Jonge, L. M. Koymans, H. M. Vinkers, F. Daeyaert, D. W. Ludovici, M. J. Kukla, B. De Corte, R. W. Kavash, C. Y. Ho, H. Ye, M. A. Lichtenstein, K. Andries, R. Pauwels, M. P. De Bethune, P. L. Boyer, P. Clark, S. H. Hughes, P. A. Janssen, and E. Arnold.** 2004. Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants. *J Med Chem* **47**:2550-60.
71. **Das, K., P. J. Lewi, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2005. Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Prog Biophys Mol Biol* **88**:209-31.
72. **Davies, J. F., 2nd, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, and D. A. Matthews.** 1991. Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**:88-95.
73. **Dayam, R., T. Sanchez, O. Clement, R. Shoemaker, S. Sei, and N. Neamati.** 2005. Beta-diketo acid pharmacophore hypothesis. 1. Discovery of a novel class of HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* **48**:111-20.
74. **De Clercq, E.** 1993. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. *Med Res Rev* **13**:229-58.
75. **De Clercq, E.** 2004. New Anti-HIV Agents in Preclinical or Clinical Development. *Frontiers in Medicinal Chemistry Online* **1**:543-579.
76. **De Soultrait, V. R., A. Caumont-Sarcos, V. Parissi, N. Morellet, M. Ventura, C. Lenoir, S. Litvak, M. Fournier, and B. P. Roques.** 2002. A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Mol Biol* **318**:45-48.

-
77. **De Soultrait, V. R., P. Y. Lozach, R. Altmeyer, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak, and M. L. Andréola.** 2002. DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents. *J Mol Biol* **324**:195-203.
 78. **Delfraissy, P. J. F. (ed.).** 2004. *Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH-1.*, Medecine-Sciences Flammarion ed. Ministère de la santé et de la protection sociale/ANRS.
 79. **Delva, P., C. Pastori, M. Degan, G. Montesi, P. Brazzarola, and A. Lechi.** 2000. Intralymphocyte free magnesium in patients with primary aldosteronism: aldosterone and lymphocyte magnesium homeostasis. *Hypertension* **35**:113-7.
 80. **Delva, P., C. Pastori, M. Degan, G. Montesi, and A. Lechi.** 2004. Catecholamine-induced regulation in vitro and ex vivo of intralymphocyte ionized magnesium. *J Membr Biol* **199**:163-71.
 81. **Demirov, D. G., A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2002. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:955-60.
 82. **Depollier, J., M. L. Hourdou, G. Aldrian-Herrada, P. Rothwell, T. Restle, and G. Divita.** 2005. Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization. *Biochemistry* **44**:1909-18.
 83. **Deprez, E., S. Barbe, M. Kolaski, H. Leh, F. Zouhiri, C. Auclair, J. C. Brochon, M. Le Bret, and J. F. Mouscadet.** 2004. Mechanism of HIV-1 integrase inhibition by styrylquinoline derivatives in vitro. *Mol Pharmacol* **65**:85-98.
 84. **Derdowski, A., L. Ding, and P. Spearman.** 2004. A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* **78**:1230-42.
 85. **Desjobert, C., V. R. De Soultrait, A. Faure, V. Parissi, S. Litvak, L. Tarrago-Litvak, and M. Fournier.** 2004. Identification by phage display selection of a short peptide able to inhibit only the strand transfer reaction catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* **43**:13097-13105.
 86. **Dettenhofer, M., S. Cen, B. A. Carlson, L. Kleiman, and X. F. Yu.** 2000. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* **74**:8938-45.
 87. **Deval, J., K. Alvarez, B. Selmi, M. Bermond, J. Boretto, C. Guerreiro, L. Mulard, and B. Canard.** 2005. Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using alpha-boranophosphate nucleoside analogs. *J Biol Chem* **280**:3838-46.

-
88. **Deval, J., J. Courcambeck, B. Selmi, J. Boretto, and B. Canard.** 2004. Structural determinants and molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. *Curr Drug Metab* **5**:305-16.
 89. **Ding, J., K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1998. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **284**:1095-111.
 90. **Ding, J., K. Das, H. Moereels, L. Koymans, K. Andries, P. A. Janssen, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1995. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**:407-15.
 91. **Ding, J., S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1997. Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* **44**:125-38.
 92. **Divita, G., B. Muller, U. Immendorfer, M. Gautel, K. Rittinger, T. Restle, and R. S. Goody.** 1993. Kinetics of interaction of HIV reverse transcriptase with primer/template. *Biochemistry* **32**:7966-71.
 93. **Divita, G., T. Restle, and R. S. Goody.** 1993. Characterization of the dimerization process of HIV-1 reverse transcriptase heterodimer using intrinsic protein fluorescence. *FEBS Lett* **324**:153-8.
 94. **Doublet, S., S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, and T. Ellenberger.** 1998. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* **391**:251-8.
 95. **Drummond, J. E., P. Mounts, R. J. Gorelick, J. R. Casas-Finet, W. J. Bosche, L. E. Henderson, D. J. Waters, and L. O. Arthur.** 1997. Wild-type and mutant HIV type 1 nucleocapsid proteins increase the proportion of long cDNA transcripts by viral reverse transcriptase. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:533-43.
 96. **Dupont, R., L. Jeanson, J. F. Mouscadet, and P. Cotelle.** 2001. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of catechol and bis-catechol derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **11**:3175-8.
 97. **Dupuy, L. C., N. J. Kelly, T. E. Elgavish, S. C. Harvey, and C. D. Morrow.** 2003. Probing the importance of tRNA anticodon: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA genome complementarity with an HIV-1 that selects tRNA(Glu) for replication. *J Virol* **77**:8756-64.
 98. **Dyda, F., A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, and D. R. Davies.**

-
1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* **266**:1981-6.
99. **Egelé, C., E. Schaub, N. Ramalanjaona, E. Piémont, D. Ficheux, B. P. Roques, J. L. Darlix, and Y. Mély.** 2004. HIV-1 nucleocapsid protein binds to the viral DNA initiation sequences and chaperones their kissing interactions. *J Mol Biol* **342**:453-466.
100. **Engelman, A., and R. Craigie.** 1992. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* **66**:6361-9.
101. **Engelman, A., K. Mizuuchi, and R. Craigie.** 1991. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**:1211-21.
102. **Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and P. Dumas.** 1999. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure Fold Des* **7**:1439-49.
103. **Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**:303-8.
104. **Esnouf, R. M., J. Ren, A. L. Hopkins, C. K. Ross, E. Y. Jones, D. K. Stammers, and D. I. Stuart.** 1997. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3984-9.
105. **Esposito, D., and R. Craigie.** 1999. HIV integrase structure and function. *Adv Virus Res* **52**:319-33.
106. **Farnet, C. M., and F. D. Bushman.** 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* **88**:483-92.
107. **Farthing, C., H. Khanlou, and V. Yeh.** 2003. Presented at the Conference on HIV Pathogenesis and Treatment., Paris.
108. **Fassati, A., and S. P. Goff.** 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:3626-35.
109. **Faure, A., C. Calmels, C. Desjobert, M. Castroviejo, A. Caumont-Sarcos, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak, and V. Parissi.** 2005. HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **33**:977-986.
110. **Feng, J. Y., and K. S. Anderson.** 1999. Mechanistic studies examining the efficiency

-
- and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **38**:9440-8.
111. **Fischer, E., V. Rieux, J. G. Guillet, and M. Kazatchkine.** 2005. The human immunodeficiency virus preventive vaccine research at the French National Agency for acquired immunodeficiency syndrome research. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**:79-84.
112. **Fischer, U., V. W. Pollard, R. Luhrmann, M. Teufel, M. W. Michael, G. Dreyfuss, and M. H. Malim.** 1999. Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic Acids Res* **27**:4128-34.
113. **Fournier, C., J. C. Cortay, C. Carbonnelle, C. Ehresmann, R. Marquet, and P. Boulanger.** 2002. The HIV-1 Nef protein enhances the affinity of reverse transcriptase for RNA in vitro. *Virus Genes* **25**:255-69.
114. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**:341-51.
115. **Gabor, J., S. Cen, H. Javanbakht, M. Niu, and L. Kleiman.** 2002. Effect of altering the tRNA(Lys)(3) concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J Virol* **76**:9096-102.
116. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-3.
117. **Garber, D. A., G. Silvestri, and M. B. Feinberg.** 2004. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis* **4**:397-413.
118. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
119. **Gee, J. B., 2nd, R. J. Corbett, J. M. Perlman, and A. R. Lupton.** 2001. Hypermagnesemia does not increase brain intracellular magnesium in newborn swine. *Pediatr Neurol* **25**:304-8.
120. **Gerstoft, J., O. Kirk, and N. Obel.** 2003. Low efficacy and high frequency of adverse events in a randomized trial of the triple nucleoside regimen abacavir, stavudine and

-
- didanosine. *Aids* **17**:2045-2052.
121. **Goldgur, Y., F. Dyda, A. B. Hickman, T. M. Jenkins, R. Craigie, and D. R. Davies.** 1998. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9150-4.
122. **Goldschmidt, V., and R. Marquet.** 2004. Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1687-705.
123. **Goldschmidt, V., J. C. Paillart, M. Rigourd, B. Ehresmann, A. M. Aubertin, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2004. Structural variability of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **279**:35923-31.
124. **Goldschmidt, V., M. Rigourd, C. Ehresmann, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2002. Direct and indirect contributions of RNA secondary structure elements to the initiation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **277**:43233-42.
125. **Gopalakrishnan, V., J. A. Peliska, and S. J. Benkovic.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10763-7.
126. **Gotte, M., D. Arion, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg.** 2000. The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol* **74**:3579-85.
127. **Gotte, M., and M. A. Wainberg.** 2000. Biochemical mechanisms involved in overcoming HIV resistance to nucleoside inhibitors of reverse transcriptase. *Drug Resist Updat* **3**:30-38.
128. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.
129. **Greenberg, M., N. Cammack, M. Salgo, and L. Smiley.** 2004. HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev Med Virol* **14**:321-37.
130. **Grobler, J. A., K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca, and D. J. Hazuda.** 2002. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6661-6.
131. **Gulick, R., H. Ribaud, and C. Shikuma.** 2003. Presented at the 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment., Paris.

-
132. **Guo, F., S. Cen, M. Niu, H. Javanbakht, and L. Kleiman.** 2003. Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNA(Lys) incorporation, tRNA(3)(Lys) annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:9817-22.
133. **Guo, J., T. Wu, B. F. Kane, D. G. Johnson, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, and J. G. Levin.** 2002. Subtle alterations of the native zinc finger structures have dramatic effects on the nucleic acid chaperone activity of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **76**:4370-8.
134. **Haffar, O. K., S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, and M. Bukrinsky.** 2000. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* **299**:359-68.
135. **Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-14.
136. **Harrich, D., C. Ulich, L. F. Garcia-Martinez, and R. B. Gaynor.** 1997. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *Embo J* **16**:1224-35.
137. **Harris, D., R. Lee, H. S. Misra, P. K. Pandey, and V. N. Pandey.** 1998. The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry* **37**:5903-8.
138. **Hartley, O., H. Gaertner, J. Wilken, D. Thompson, R. Fish, A. Ramos, C. Pastore, B. Dufour, F. Cerini, A. Melotti, N. Heveker, L. Picard, M. Alizon, D. Mosier, S. Kent, and R. Offord.** 2004. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16460-5.
139. **Hazuda, D. J., N. J. Anthony, R. P. Gomez, S. M. Jolly, J. S. Wai, L. Zhuang, T. E. Fisher, M. Embrey, J. P. Guare, Jr., M. S. Egbertson, J. P. Vacca, J. R. Huff, P. J. Felock, M. V. Witmer, K. A. Stillmock, R. Danovich, J. Grobler, M. D. Miller, A. S. Espeseth, L. Jin, I. W. Chen, J. H. Lin, K. Kassahun, J. D. Ellis, B. K. Wong, W. Xu, P. G. Pearson, W. A. Schleif, R. Cortese, E. Emini, V. Summa, M. K. Holloway, and S. D. Young.** 2004. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11233-8.
140. **Hazuda, D. J., S. D. Young, J. P. Guare, N. J. Anthony, R. P. Gomez, J. S. Wai, J. P. Vacca, L. Handt, S. L. Motzel, H. J. Klein, G. Dornadula, R. M. Danovich, M. V. Witmer, K. A. Wilson, L. Tussey, W. A. Schleif, L. S. Gabryelski, L. Jin, M. D.**

-
- Miller, D. R. Casimiro, E. A. Emini, and J. W. Shiver.** 2004. Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* **305**:528-32.
141. **Heilman-Miller, S. L., T. Wu, and J. G. Levin.** 2004. Alteration of nucleic acid structure and stability modulates the efficiency of minus-strand transfer mediated by the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **279**:44154-65.
142. **Hill, M., G. Tachedjian, and J. Mak.** 2005. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* **3**:73-85.
143. **Hogberg, M., C. Sahlberg, P. Engelhardt, R. Noreen, J. Kangasmetsa, N. G. Johansson, B. Oberg, L. Vrang, H. Zhang, B. L. Sahlberg, T. Unge, S. Lovgren, K. Fridborg, and K. Backbro.** 1999. Urea-PETT compounds as a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 3. Synthesis and further structure-activity relationship studies of PETT analogues. *J Med Chem* **42**:4150-60.
144. **Holman, A., and J. M. Coffin.** 2005. Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6103-6107.
145. **Hooker, C. W., W. B. Lott, and D. Harrich.** 2001. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *J Virol* **75**:3095-104.
146. **Hope, T. J.** 1999. The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys* **365**:186-91.
147. **Hostomska, Z., D. A. Matthews, J. F. Davies, 2nd, B. R. Nides, and Z. Hostomsky.** 1991. Proteolytic release and crystallization of the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **266**:14697-702.
148. **Hsieh, J. C., S. Zinnen, and P. Modrich.** 1993. Kinetic mechanism of the DNA-dependent DNA polymerase activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem* **268**:24607-13.
149. **Hsiou, Y., K. Das, J. Ding, A. D. Clark, Jr., J. P. Kleim, M. Rosner, I. Winkler, G. Riess, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1998. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J Mol Biol* **284**:313-23.
150. **Hsiou, Y., J. Ding, K. Das, A. D. Clark, Jr., P. L. Boyer, P. Lewi, P. A. Janssen, J. P. Kleim, M. Rosner, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2001. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol* **309**:437-45.
151. **Hsiou, Y., J. Ding, K. Das, A. D. Clark, Jr., S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1996.

-
- Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **4**:853-60.
152. **Hu, W. S., and H. M. Temin.** 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-33.
153. **Huang, H., R. Chopra, G. L. Verdine, and S. C. Harrison.** 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**:1669-75.
154. **Huang, H., S. C. Harrison, and G. L. Verdine.** 2000. Trapping of a catalytic HIV reverse transcriptase*template:primer complex through a disulfide bond. *Chem Biol* **7**:355-64.
155. **Huang, M., A. Maynard, J. A. Turpin, L. Graham, G. M. Janini, D. G. Covell, and W. G. Rice.** 1998. Anti-HIV agents that selectively target retroviral nucleocapsid protein zinc fingers without affecting cellular zinc finger proteins. *J Med Chem* **41**:1371-81.
156. **Huang, Y., J. Mak, Q. Cao, Z. Li, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1994. Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:7676-83.
157. **Huang, Y., J. Wang, A. Shalom, Z. Li, A. Khorchid, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1997. Primer tRNA^{3Lys} on the viral genome exists in unextended and two-base extended forms within mature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**:726-8.
158. **Isel, C., C. Ehresmann, G. Keith, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1995. Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol* **247**:236-50.
159. **Isel, C., C. Ehresmann, P. Walter, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2001. The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **276**:48725-32.
160. **Isel, C., J. M. Lanchy, S. F. Le Grice, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA^{3Lys}. *Embo J* **15**:917-24.
161. **Isel, C., E. Westhof, C. Massire, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1999. Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1

-
- reverse transcription. *Embo J* **18**:1038-48.
162. **Ito, T., and M. M. Lai.** 1997. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* **71**:8698-706.
163. **Iwatani, Y., A. E. Rosen, J. Guo, K. Musier-Forsyth, and J. G. Levin.** 2003. Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription in vitro. Requirement for RNA sequences downstream of the primer binding site abrogated by nucleocapsid protein-dependent primer-template interactions. *J Biol Chem* **278**:14185-95.
164. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
165. **Jacobo-Molina, A., J. Ding, R. G. Nanni, A. D. Clark, Jr., X. Lu, C. Tantillo, R. L. Williams, G. Kamer, A. L. Ferris, P. Clark, and et al.** 1993. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6320-4.
166. **Javanbakht, H., S. Cen, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2002. Correlation between tRNA^{Lys3} aminoacylation and its incorporation into HIV-1. *J Biol Chem* **277**:17389-96.
167. **Jemsek, J., P. Hutcherson, and E. Harper.** 2004. Presented at the 11th CROI, San Francisco.
168. **Jenkins, T. M., A. Engelman, R. Ghirlando, and R. Craigie.** 1996. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J Biol Chem* **271**:7712-8.
169. **Jenkins, Y., M. McEntee, K. Weis, and W. C. Greene.** 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* **143**:875-85.
170. **Johnson, A. A., C. Marchand, and Y. Pommier.** 2004. HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr Top Med Chem* **4**:1059-77.
171. **Johnson, M. A., and A. Fridland.** 1989. Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol Pharmacol* **36**:291-5.
172. **Johnson, M. S., M. A. McClure, D. F. Feng, J. Gray, and R. F. Doolittle.** 1986. Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7648-52.
173. **Joseph, A. M., M. Kumar, and D. Mitra.** 2005. Nef: "necessary and enforcing factor"

-
- in HIV infection. *Curr HIV Res* **3**:87-94.
174. **Jung, A., R. Maier, J. P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**:144.
175. **Kameoka, M., M. Morgan, M. Binette, R. S. Russell, L. Rong, X. Guo, A. Mouland, L. Kleiman, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2002. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J Virol* **76**:3637-45.
176. **Karacostas, V., E. J. Wolffe, K. Nagashima, M. A. Gonda, and B. Moss.** 1993. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* **193**:661-71.
177. **Karn, J.** 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**:235-54.
178. **Kashanchi, F., M. R. Sadaie, and J. N. Brady.** 1997. Inhibition of HIV-1 transcription and virus replication using soluble Tat peptide analogs. *Virology* **227**:431-8.
179. **Kati, W. M., K. A. Johnson, L. F. Jerva, and K. S. Anderson.** 1992. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* **267**:25988-97.
180. **Katz, R. A., J. G. Greger, P. Boimel, and A. M. Skalka.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 DNA nuclear import and integration are mitosis independent in cycling cells. *J Virol* **77**:13412-7.
181. **Katz, R. A., and A. M. Skalka.** 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* **63**:133-73.
182. **Keck, J. L., E. R. Goedken, and S. Marqusee.** 1998. Activation/attenuation model for RNase H. A one-metal mechanism with second-metal inhibition. *J Biol Chem* **273**:34128-33.
183. **Kempf, D. J., K. C. Marsh, G. Kumar, A. D. Rodrigues, J. F. Denissen, E. McDonald, M. J. Kukulka, A. Hsu, G. R. Granneman, P. A. Baroldi, E. Sun, D. Pizzuti, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, and J. M. Leonard.** 1997. Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:654-60.
184. **Khorchid, A., R. Halwani, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2002. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* **76**:4131-7.
185. **Khorchid, A., H. Javanbakht, S. Wise, R. Halwani, M. A. Parniak, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2000. Sequences within Pr160gag-pol affecting the selective

-
- packaging of primer tRNA(Lys3) into HIV-1. *J Mol Biol* **299**:17-26.
186. **Kleiman, L., and S. Cen.** 2004. The tRNA^{Lys} packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1776-86.
187. **Kleiman, L., R. Halwani, and H. Javanbakht.** 2004. The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res* **2**:163-75.
188. **Klumpp, K., J. Q. Hang, S. Rajendran, Y. Yang, A. Derosier, P. Wong Kai In, H. Overton, K. E. Parkes, N. Cammack, and J. A. Martin.** 2003. Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors. *Nucleic Acids Res* **31**:6852-9.
189. **Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, and T. A. Steitz.** 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**:1783-90.
190. **Krebs, R., U. Immendorfer, S. H. Thrall, B. M. Wohrl, and R. S. Goody.** 1997. Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-TC. *Biochemistry* **36**:10292-300.
191. **Krishnamoorthy, G., B. P. Roques, J. L. Darlix, and Y. Mély.** 2003. DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acids Res* **31**:5425-5432.
192. **Kruhoffer, M., C. Urbanke, and F. Grosse.** 1993. Two step binding of HIV-1 reverse transcriptase to nucleic acid substrates. *Nucleic Acids Res* **21**:3943-9.
193. **Kulkosky, J., K. S. Jones, R. A. Katz, J. P. Mack, and A. M. Skalka.** 1992. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* **12**:2331-8.
194. **Lanchy, J. M., C. Ehresmann, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. Binding and kinetic properties of HIV-1 reverse transcriptase markedly differ during initiation and elongation of reverse transcription. *Embo J* **15**:7178-87.
195. **Lanchy, J. M., G. Keith, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1998. Contacts between reverse transcriptase and the primer strand govern the transition from initiation to elongation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **273**:24425-32.
196. **Lavie, A., I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, and R. S. Goody.** 1997. The bottleneck in AZT activation. *Nat Med* **3**:922-4.
197. **Lavie, A., I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, and I. Schlichting.** 1997. Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in

-
- AZT activation. *Nat Struct Biol* **4**:601-4.
198. **Le Grice, S. F., T. Naas, B. Wohlgeninger, and O. Schatz.** 1991. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *Embo J* **10**:3905-11.
199. **Leh, H., P. Brodin, J. Bischerour, E. Deprez, P. Tauc, J. C. Brochon, E. LeCam, D. Coulaud, C. Auclair, and J. F. Mouscadet.** 2000. Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* **39**:9285-94.
200. **Lennerstrand, J., K. Hertogs, D. K. Stammers, and B. A. Larder.** 2001. Correlation between viral resistance to zidovudine and resistance at the reverse transcriptase level for a panel of human immunodeficiency virus type 1 mutants. *J Virol* **75**:7202-5.
201. **LePecq, J. B., and C. Paoletti.** 1967. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol* **27**:87-106.
202. **Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**:4085-7.
203. **Levy, Y., H. Gahery-Segard, C. Durier, A. S. Lascaux, C. Goujard, V. Meiffredy, C. Rouzioux, R. E. Habib, M. Beumont-Mauviel, J. G. Guillet, J. F. Delfraissy, and J. P. Aboulker.** 2005. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids* **19**:279-86.
204. **Li, M., and R. Craigie.** 2005. Processing of Viral DNA Ends Channels the HIV-1 Integration Reaction to Concerted Integration. *J Biol Chem* **280**:29334-9.
205. **Liang, C., L. Rong, M. Gotte, X. Li, Y. Quan, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 1998. Mechanistic studies of early pausing events during initiation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **273**:21309-15.
206. **Lins, R. D., T. P. Straatsma, and J. M. Briggs.** 2000. Similarities in the HIV-1 and ASV integrase active sites upon metal cofactor binding. *Biopolymers* **53**:308-15.
207. **Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-77.
208. **Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose, and J. I. Mullins.** 1999. Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1492-7.

-
209. **Luban, J.** 1996. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**:1157-9.
210. **Luster, A. D.** 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**:436-45.
211. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-48.
212. **Maignan, S., J. P. Guilloteau, Q. Zhou-Liu, C. Clement-Mella, and V. Mikol.** 1998. Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases. *J Mol Biol* **282**:359-68.
213. **Mak, J., A. Khorchid, Q. Cao, Y. Huang, I. Lowy, M. A. Parniak, V. R. Prasad, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1997. Effects of mutations in Pr160gag-pol upon tRNA(Lys3) and Pr160gag-plo incorporation into HIV-1. *J Mol Biol* **265**:419-31.
214. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
215. **Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
216. **Mansky, L. M., S. Preveral, L. Selig, R. Benarous, and S. Benichou.** 2000. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol* **74**:7039-47.
217. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**:5087-94.
218. **Marcello, A., M. Zoppe, and M. Giacca.** 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* **51**:175-81.
219. **Marchand, B., and M. Gotte.** 2003. Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J Biol Chem* **278**:35362-72.
220. **Marchand, C., A. A. Johnson, R. G. Karki, G. C. Pais, X. Zhang, K. Cowansage, T. A. Patel, M. C. Nicklaus, T. R. Burke, Jr., and Y. Pommier.** 2003. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S). *Mol Pharmacol* **64**:600-9.

-
221. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-403.
222. **Maroun, R. G., S. Gayet, M. S. Benleulmi, H. Porumb, L. Zargarian, H. Merad, H. Leh, J. F. Mouscadet, F. Troalen, and S. Femandjian.** 2001. Peptide inhibitors of HIV-1 integrase dissociate the enzyme oligomers. *Biochemistry* **40**:13840-8.
223. **Marquet, R., C. Isel, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptase. *Biochimie* **77**:113-124.
224. **Marsili, G., A. L. Remoli, M. Sgarbanti, and A. Battistini.** 2004. Role of Acetylases and Deacetylase Inhibitors in IRF-1-Mediated HIV-1 Long Terminal Repeat Transcription. *Ann N Y Acad Sci* **1030**:636-43.
225. **Martin, J. L., J. E. Wilson, R. L. Haynes, and P. A. Furman.** 1993. Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6135-9.
226. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**:1313-9.
227. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**:4794-804.
228. **Marzio, G., M. Tyagi, M. I. Gutierrez, and M. Giacca.** 1998. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13519-24.
229. **Maxfield, L. F., C. D. Fraize, and J. M. Coffin.** 2005. Relationship between retroviral DNA-integration-site selection and host cell transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1436-1441.
230. **Mayaux, J. F., A. Bousseau, R. Pauwels, T. Huet, Y. Henin, N. Dereu, M. Evers, F. Soler, C. Poujade, E. De Clercq, and et al.** 1994. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3564-8.
231. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. M. Mian, A. G. So, and W. A. Scott.** 1999. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* **4**:35-43.
232. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, R. F. Schinazi, A. G. So, and W. A. Scott.** 2000. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother*

44:3465-72.

233. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. G. So, and W. A. Scott.** 1998. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13471-6.
234. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. A. Tolun, I. Pfeifer, A. G. So, J. W. Mellors, and W. A. Scott.** 2002. Effects of specific zidovudine resistance mutations and substrate structure on nucleotide-dependent primer unblocking by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1540-5.
235. **Mihailescu, M. R., and J. P. Marino.** 2004. A proton-coupled dynamic conformational switch in the HIV-1 dimerization initiation site kissing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1189-94.
236. **Mildvan, D., U. Mathur, R. W. Enlow, P. L. Romain, R. J. Winchester, C. Colp, H. Singman, B. R. Adelsberg, and I. Spigland.** 1982. Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Intern Med* **96**:700-4.
237. **Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**:5382-90.
238. **Miller, V., T. Stark, A. E. Loeliger, and J. M. Lange.** 2002. The impact of the M184V substitution in HIV-1 reverse transcriptase on treatment response. *HIV Med* **3**:135-45.
239. **Molla, A., G. R. Granneman, E. Sun, and D. J. Kempf.** 1998. Recent developments in HIV protease inhibitor therapy. *Antiviral Res* **39**:1-23.
240. **Morellet, N., S. Druillennec, C. Lenoir, S. Bouaziz, and B. P. Roques.** 2005. Helical structure determined by NMR of the HIV-1 (345-392)Gag sequence, surrounding p2: implications for particle assembly and RNA packaging. *Protein Sci* **14**:375-86.
241. **Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2000. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* **74**:5441-51.
242. **Moulard, M., H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong, and Q. J. Sattentau.** 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **74**:1948-60.
243. **Moutouh, L., J. Corbeil, and D. D. Richman.** 1996. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6106-11.

-
244. **Muriaux, D., H. De Rocquigny, B. P. Roques, and J. Paoletti.** 1996. NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J Biol Chem* **271**:33686-92.
245. **Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-51.
246. **Naeger, L. K., N. A. Margot, and M. D. Miller.** 2002. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2179-84.
247. **Neamati, N., H. Hong, J. M. Owen, S. Sunder, H. E. Winslow, J. L. Christensen, H. Zhao, T. R. Burke, Jr., G. W. Milne, and Y. Pommier.** 1998. Salicylhydrazine-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for a selective chelation in the integrase active site. *J Med Chem* **41**:3202-9.
248. **Negroni, M., and H. Buc.** 2001. Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet* **35**:275-302.
249. **Nermut, M. V., and A. Fassati.** 2003. Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J Virol* **77**:8196-206.
250. **Nowotny, M., S. A. Gaidamakov, R. J. Crouch, and W. Yang.** 2005. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal catalysis. *Cell* **121**:1005-1016.
251. **O'Reilly, M. M., M. T. McNally, and K. L. Beemon.** 1995. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**:373-85.
252. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-30.
253. **Paillart, J. C., M. Dettenhofer, X. F. Yu, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2004. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem* **279**:48397-403.
254. **Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-72.
255. **Pais, G. C., X. Zhang, C. Marchand, N. Neamati, K. Cowansage, E. S. Svarovskaia, V. K. Pathak, Y. Tang, M. Nicklaus, Y. Pommier, and T. R. Burke, Jr.** 2002. Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo-containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* **45**:3184-94.
256. **Panganiban, A. T., and D. Fiore.** 1988. Ordered interstrand and intrastrand DNA

-
- transfer during reverse transcription. *Science* **241**:1064-9.
257. **Pari, K., G. A. Mueller, E. F. DeRose, T. W. Kirby, and R. E. London.** 2003. Solution structure of the RNase H domain of the HIV-1 reverse transcriptase in the presence of magnesium. *Biochemistry* **42**:639-50.
258. **Pata, J. D., W. G. Stirtan, S. W. Goldstein, and T. A. Steitz.** 2004. Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to an inhibitor active against mutant reverse transcriptases resistant to other nonnucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10548-53.
259. **Patel, P. H., A. Jacobo-Molina, J. Ding, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., R. Raag, R. G. Nanni, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1995. Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:5351-63.
260. **Paxton, W., R. I. Connor, and N. R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* **67**:7229-37.
261. **Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon.** 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**:663-8.
262. **Pettit, S. C., L. E. Everitt, S. Choudhury, B. M. Dunn, and A. H. Kaplan.** 2004. Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J Virol* **78**:8477-85.
263. **Pialoux, G., H. Gahery-Segard, S. Sermet, H. Poncelet, S. Fournier, L. Gerard, A. Tartar, H. Gras-Masse, J. P. Levy, and J. G. Guillet.** 2001. Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *Aids* **15**:1239-49.
264. **Piettre, S. R., C. Andre, M. C. Chanal, J. B. Ducep, B. Lesur, F. Piriou, P. Raboisson, J. M. Rondeau, C. Schelcher, P. Zimmermann, and A. J. Ganzhorn.** 1997. Monoaryl- and bisaryldihydroxytropolones as potent inhibitors of inositol monophosphatase. *J Med Chem* **40**:4208-21.
265. **Piller, S. C., L. Caly, and D. A. Jans.** 2003. Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets* **4**:409-29.
266. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7415-9.
267. **Poppe, S. M., D. E. Slade, K. T. Chong, R. R. Hinshaw, P. J. Pagano, M. Markowitz,**

-
- D. D. Ho, H. Mo, R. R. Gorman, 3rd, T. J. Dueweke, S. Thaisrivongs, and W. G. Tarpley.** 1997. Antiviral activity of the dihydropyridone PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1058-63.
268. **Preston, B. D., B. J. Poiesz, and L. A. Loeb.** 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1168-71.
269. **Provitera, P., A. Goff, A. Harenberg, F. Bouamr, C. Carter, and S. Scarlata.** 2001. Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* **40**:5565-72.
270. **Ray, A. S., E. Murakami, A. Basavapathruni, J. A. Vaccaro, D. Ulrich, C. K. Chu, R. F. Schinazi, and K. S. Anderson.** 2003. Probing the molecular mechanisms of AZT drug resistance mediated by HIV-1 reverse transcriptase using a transient kinetic analysis. *Biochemistry* **42**:8831-41.
271. **Ray, A. S., Z. Yang, J. Shi, A. Hobbs, R. F. Schinazi, C. K. Chu, and K. S. Anderson.** 2002. Insights into the molecular mechanism of inhibition and drug resistance for HIV-1 RT with carbovir triphosphate. *Biochemistry* **41**:5150-62.
272. **Reardon, J. E.** 1993. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. A kinetic analysis of RNA-dependent and DNA-dependent DNA polymerization. *J Biol Chem* **268**:8743-51.
273. **Reicin, A. S., G. Kalpana, S. Paik, S. Marmon, and S. Goff.** 1995. Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *J Virol* **69**:5904-7.
274. **Ren, J., L. E. Bird, P. P. Chamberlain, G. B. Stewart-Jones, D. I. Stuart, and D. K. Stammers.** 2002. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14410-5.
275. **Ren, J., R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Darby, Y. Jones, D. Stuart, and et al.** 1995. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol* **2**:293-302.
276. **Renda, M. J., J. D. Rosenblatt, E. Klimatcheva, L. M. Demeter, R. A. Bambara, and V. Planelles.** 2001. Mutation of the methylated tRNA(Lys)(3) residue A58 disrupts reverse transcription and inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:9671-8.
277. **Rhodes, T. D., O. Nikolaitchik, J. Chen, D. Powell, and W. S. Hu.** 2005. Genetic recombination of human immunodeficiency virus type 1 in one round of viral

-
- replication: effects of genetic distance, target cells, accessory genes, and lack of high negative interference in crossover events. *J Virol* **79**:1666-77.
278. **Rigourd, M., G. Bec, P. Benas, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2003. Effects of tRNA 3 Lys aminoacylation on the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Biochimie* **85**:521-5.
279. **Rigourd, M., J. M. Lanchy, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2000. Inhibition of the initiation of HIV-1 reverse transcription by 3'-azido-3'-deoxythymidine. Comparison with elongation. *J Biol Chem* **275**:26944-51.
280. **Rist, M. J., and J. P. Marino.** 2002. Mechanism of nucleocapsid protein catalyzed structural isomerization of the dimerization initiation site of HIV-1. *Biochemistry* **41**:14762-70.
281. **Rittinger, K., G. Divita, and R. S. Goody.** 1995. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8046-9.
282. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-3.
283. **Roberts, J. D., B. D. Preston, L. A. Johnston, A. Soni, L. A. Loeb, and T. A. Kunkel.** 1989. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Mol Cell Biol* **9**:469-76.
284. **Robinson, W. E., Jr., M. Cordeiro, S. Abdel-Malek, Q. Jia, S. A. Chow, M. G. Reinecke, and W. M. Mitchell.** 1996. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Mol Pharmacol* **50**:846-55.
285. **Rodgers, D. W., S. J. Gamblin, B. A. Harris, S. Ray, J. S. Culp, B. Hellmig, D. J. Woolf, C. Debouck, and S. C. Harrison.** 1995. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1222-6.
286. **Roques, B. P., N. Morellet, H. De Rocquigny, H. Demene, W. Schueler, and N. Jullian.** 1997. Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* **79**:673-680.
287. **Russell, R. S., A. Roldan, M. Detorio, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* **77**:12986-95.
288. **Sandefur, S., R. M. Smith, V. Varthakavi, and P. Spearman.** 2000. Mapping and

-
- characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* **74**:7238-49.
289. **Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Gally.** 2002. Cyclophilin a plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation. *J Virol* **76**:4671-7.
290. **Sarafianos, S. G., A. D. Clark, Jr., S. Tuske, C. J. Squire, K. Das, D. Sheng, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, H. Kroth, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2003. Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA. *J Biol Chem* **278**:16280-8.
291. **Sarafianos, S. G., K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2001. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *Embo J* **20**:1449-61.
292. **Sarngadharan, M. G., M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach, and R. C. Gallo.** 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**:506-8.
293. **Scarlata, S., and C. Carter.** 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* **1614**:62-72.
294. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
295. **Schuster, C., C. Isel, I. Imbert, C. Ehresmann, R. Marquet, and M. P. Kieny.** 2002. Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J Virol* **76**:8058-68.
296. **Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* **69**:4053-9.
297. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* **64**:5448-56.
298. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* **12**:207-19.
299. **Selmi, B., J. Boretto, S. R. Sarfati, C. Guerreiro, and B. Canard.** 2001. Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an alpha-boranophosphate nucleoside analogue. *J*

Biol Chem **276**:48466-72.

300. **Severini, A., and A. R. Morgan.** 1991. An assay for proteinases and their inhibitors based on DNA/ethidium bromide fluorescence. *Anal Biochem* **193**:83-9.
301. **Shaw-Reid, C. A., V. Munshi, P. Graham, A. Wolfe, M. Witmer, R. Danzeisen, D. B. Olsen, S. S. Carroll, M. Embrey, J. S. Wai, M. D. Miller, J. L. Cole, and D. J. Hazuda.** 2003. Inhibition of HIV-1 ribonuclease H by a novel diketo acid, 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid. *J Biol Chem* **278**:2777-80.
302. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-7.
303. **Sinha, S., and D. P. Grandgenett.** 2005. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase exhibits a capacity for full-site integration in vitro that is comparable to that of purified preintegration complexes from virus-infected cells. *J Virol* **79**:8208-16.
304. **Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4945-9.
305. **Sluis-Cremer, N., D. Arion, N. Kaushik, H. Lim, and M. A. Parniak.** 2000. Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J* **348 Pt 1**:77-82.
306. **Sluis-Cremer, N., D. Arion, and M. A. Parniak.** 2002. Destabilization of the HIV-1 reverse transcriptase dimer upon interaction with N-acyl hydrazone inhibitors. *Mol Pharmacol* **62**:398-405.
307. **Smith, A. J., P. R. Meyer, D. Asthana, M. R. Ashman, and W. A. Scott.** 2005. Intracellular substrates for the primer-unblocking reaction by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: detection and quantitation in extracts from quiescent- and activated-lymphocyte subpopulations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1761-9.
308. **Smith, C. M., O. Leon, J. S. Smith, and M. J. Roth.** 1998. Sequence requirements for removal of tRNA by an isolated human immunodeficiency virus type 1 RNase H domain. *J Virol* **72**:6805-12.
309. **Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson, and K. A. Johnson.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**:988-93.
310. **St Clair, M. H., J. L. Martin, G. Tudor-Williams, M. C. Bach, C. L. Vavro, D. M.**

-
- King, P. Kellam, S. D. Kemp, and B. A. Larder.** 1991. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **253**:1557-9.
311. **Starnes, M. C., and Y. C. Cheng.** 1989. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *J Biol Chem* **264**:7073-7.
312. **Staszewski, S., P. Keiser, and J. Montaner.** 2001. Abacavir-lamivudine-zidovudine versus indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral naive HIV-infected adults: a randomized equivalence trial. *JAMA* **285**:1155-1163.
313. **Strebel, K.** 2003. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* **17 Suppl 4**:S25-34.
314. **Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2004. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* **279**:36059-71.
315. **Tachedjian, G., J. W. Mellors, H. Bazmi, and J. Mills.** 1998. Impaired fitness of foscarnet-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:1059-64.
316. **Takahashi, H., M. Matsuda, A. Kojima, T. Sata, T. Andoh, T. Kurata, K. Nagashima, and W. W. Hall.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: enhancement of activity by interaction with cellular topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5694-8.
317. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. Hall, and T. Kurata.** 2002. Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. *Biochem Biophys Res Commun* **297**:593-9.
318. **Takahashi, H., M. Tatsumi, M. Matsuda, K. Nagashima, T. Kurata, and W. W. Hall.** 1997. The role of topoisomerase I in HIV-1 replication. *Leukemia* **11 Suppl 3**:113-5.
319. **Tasara, T., G. Maga, M. O. Hottiger, and U. Hubscher.** 2001. HIV-1 reverse transcriptase and integrase enzymes physically interact and inhibit each other. *FEBS Lett* **507**:39-44.
320. **Theilleux-Delalande, V., F. Girard, T. Huynh-Dinh, G. Lancelot, and J. Paoletti.** 2000. The HIV-1(Lai) RNA dimerization. Thermodynamic parameters associated with the transition from the kissing complex to the extended dimer. *Eur J Biochem* **267**:2711-9.

-
321. **Tiley, L. S., M. H. Malim, H. K. Tewary, P. G. Stockley, and B. R. Cullen.** 1992. Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:758-62.
322. **Tisne, C., B. P. Roques, and F. Dardel.** 2004. The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J Biol Chem* **279**:3588-3595.
323. **Tisne, C., B. P. Roques, and F. Dardel.** 2003. Specific recognition of primer tRNA Lys 3 by HIV-1 nucleocapsid protein: involvement of the zinc fingers and the N-terminal basic extension. *Biochimie* **85**:557-561.
324. **Tubiana, R., G. Carcelain, M. Vray, K. Gourelain, C. Dalban, A. Chermak, C. Rabian, D. Vittecoq, A. Simon, E. Bouvet, R. E. Habib, D. Costagliola, V. Calvez, B. Autran, and C. Katlama.** 2005. Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine* **23**:4292-4301.
325. **Turpin, J. A.** 2002. Considerations and development of topical microbicides to inhibit the sexual transmission of HIV. *Expert Opin Investig Drugs* **11**:1077-97.
326. **Turpin, J. A., R. W. Buckheit, Jr., D. Derse, M. Hollingshead, K. Williamson, C. Palamone, M. C. Osterling, S. A. Hill, L. Graham, C. A. Schaeffer, M. Bu, M. Huang, W. M. Cholody, C. J. Michejda, and W. G. Rice.** 1998. Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:487-94.
327. **Tuske, S., S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., J. Ding, L. K. Naeger, K. L. White, M. D. Miller, C. S. Gibbs, P. L. Boyer, P. Clark, G. Wang, B. L. Gaffney, R. A. Jones, D. M. Jerina, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2004. Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol* **11**:469-74.
328. **Van Leth, F., P. Phanuphak, and K. Ruxrungtham.** 2004. Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and lamivudine : a randomized open-label trial, the 2NN Study. *Lancet*:1253-1263.
329. **van Wamel, J. L., and B. Berkhout.** 1998. The first strand transfer during HIV-1 reverse transcription can occur either intramolecularly or intermolecularly. *Virology* **244**:245-51.
330. **VaxGen.** Presented at the VaxGen Inc. Press Release 2003 Feb 24, <http://vaxgen.com/pressroom/index.html>.

-
331. **Vermeire, K., D. Schols, and T. W. Bell.** 2004. CD4 down-modulating compounds with potent anti-HIV activity. *Curr Pharm Des* **10**:1795-803.
332. **Wakefield, J. K., S. M. Kang, and C. D. Morrow.** 1996. Construction of a type 1 human immunodeficiency virus that maintains a primer binding site complementary to tRNA(His). *J Virol* **70**:966-75.
333. **Wang, J., S. J. Smerdon, J. Jager, L. A. Kohlstaedt, P. A. Rice, J. M. Friedman, and T. A. Steitz.** 1994. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7242-6.
334. **Wang, J. Y., H. Ling, W. Yang, and R. Craigie.** 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *Embo J* **20**:7333-43.
335. **Wang, S., E. H. McDonnell, F. A. Sedor, and J. G. Toffaletti.** 2002. pH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood. *Arch Pathol Lab Med* **126**:947-50.
336. **Wiegand, H. L., B. P. Doehle, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* **23**:2451-8.
337. **Wiegers, K., G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg, and H. G. Krausslich.** 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* **72**:2846-54.
338. **Wild, C., T. Greenwell, and T. Matthews.** 1993. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:1051-3.
339. **Wilk, T., B. Gowen, and S. D. Fuller.** 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol* **73**:1931-40.
340. **Williams, M. C., I. Rouzina, J. R. Wenner, R. J. Gorelick, K. Musier-Forsyth, and V. A. Bloomfield.** 2001. Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6121-6.
341. **Wlodawer, A.** 1999. Crystal structures of catalytic core domains of retroviral integrases and role of divalent cations in enzymatic activity. *Adv Virus Res* **52**:335-50.
342. **Wondrak, E. M., J. Lower, and R. Kurth.** 1986. Functional purification and enzymic characterization of the RNA-dependent DNA polymerase of human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* **67 (Pt 12)**:2791-7.

-
343. **Wu, T., J. Guo, J. Bess, L. E. Henderson, and J. G. Levin.** 1999. Molecular requirements for human immunodeficiency virus type 1 plus-strand transfer: analysis in reconstituted and endogenous reverse transcription systems. *J Virol* **73**:4794-805.
344. **Wu, W., L. E. Henderson, T. D. Copeland, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, A. Rein, and J. G. Levin.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *J Virol* **70**:7132-42.
345. **Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hehl, G. V. Kalpana, V. Prasad, and J. C. Kappes.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol* **73**:2126-35.
346. **Yang, W., and T. A. Steitz.** 1995. Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure* **3**:131-4.
347. **Zemmel, R. W., A. C. Kelley, J. Karn, and P. J. Butler.** 1996. Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J Mol Biol* **258**:763-77.
348. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
349. **Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.
350. **Zhang, H., Y. Zhang, T. Spicer, D. Henrard, and B. J. Poiesz.** 1995. Nascent human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription occurs within an enveloped particle. *J Virol* **69**:3675-82.
351. **Zhang, Z., S. M. Kang, Y. Li, and C. D. Morrow.** 1998. Genetic analysis of the U5-PBS of a novel HIV-1 reveals multiple interactions between the tRNA and RNA genome required for initiation of reverse transcription. *Rna* **4**:394-406.
352. **Zheng, Y. H., D. Irwin, T. Kurosu, K. Tokunaga, T. Sata, and B. M. Peterlin.** 2004. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **78**:6073-6.
353. **Zhu, K., C. Dobard, and S. A. Chow.** 2004. Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J Virol* **78**:5045-55.

-
354. **Zouhiri, F., J. F. Mouscadet, K. Mekouar, D. Desmaele, D. Savoure, H. Leh, F. Subra, M. Le Bret, C. Auclair, and J. d'Angelo.** 2000. Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture. *J Med Chem* **43**:1533-40.
355. **Zussman, A., L. Lara, H. H. Lara, Z. Bentwich, and G. Borkow.** 2003. Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781. *Aids* **17**:653-61.

Étude d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la rétrotranscriptase et de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1).

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que le VIH-1 est porté par 40 millions de personnes à travers le monde, et qu'il a causé 3,1 millions de décès et 4,9 millions de nouvelles infections au cours de l'année 2004. Les traitements actuels ciblent principalement la rétrotranscriptase du VIH-1 (RT), qui catalyse le passage de l'ARN viral génomique en ADN double brin, substrat de l'intégrase virale (IN). Les antiviraux dirigés contre la RT et utilisés en thérapie sont soit des terminateurs de chaîne analogues de nucléosides (NRTIs), soit des inhibiteurs non-nucléosidiques (NNRTIs) qui se fixent au niveau d'une poche hydrophobe, à proximité du site de fixation des nucléotides.

Dans le cadre du développement de nouveaux inhibiteurs de la RT, nous nous sommes intéressés aux 3,7-dihydroxytropolones (3,7-DHT), qui inhibent l'inositol monophosphatase humaine par chélation de deux ions Mg^{2+} catalytiques distants de 3,7Å. Or les sites catalytiques polymérase et RNase H de la RT contiennent respectivement deux ions Mg^{2+} distants de 3,57 et 4Å. En outre, l'IN du VIH-1 possède une plate-forme catalytique proche de celle du site RNase H. Nous avons ainsi entrepris d'étudier l'effet des 3,7-DHT sur les activités de la RT et de l'IN du VIH-1.

Nous avons observé une inhibition spécifique de l'une ou l'autre activité de la RT par certaines 3,7-DHT. Des études enzymatiques ont ensuite montré que l'inhibition de l'activité ADN polymérase est non-compétitive vis-à-vis des nucléotides, à l'instar des NNRTIs. Néanmoins, l'étude de RT résistante ou dépourvue du site de fixation des NNRTIs permet d'exclure un mode d'action identique à cette classe d'inhibiteurs. Des expériences de gel-filtration, permettant de suivre l'état d'oligomérisation de la forme active de la RT, hétérodimérique, montrent que les 3,7-DHT ne sont pas capables de la dissocier. L'inhibition des activités de la RT par liaison des 3,7-DHT aux acides nucléiques a été écartée, entre autres, par des expériences de fluorescence. Enfin nous avons montré que les 3,7-DHT n'inhibent pas la polymérisation lors de l'étape de translocation.

En revanche, une forte baisse de l'inhibition de la synthèse d'ADN a été mise en évidence lorsque la concentration en Mg^{2+} diminue, ce qui suggère que les 3,7-DHT ne lient le site actif polymérase qu'en présence des ions Mg^{2+} . L'implication des cations catalytiques dans les mécanismes d'inhibition par les 3,7-DHT a également été étayée par l'observation d'une inhibition des activités de «Processing» et de transfert de l'IN, dépendante du cation utilisé.

Malheureusement, des cultures cellulaires en présence de 3,7-DHT ont révélé une cytotoxicité importante. Ce résultat était partiellement prévisible, compte tenu de l'existence de nombreuses enzymes bimétalliques cellulaires et de l'utilisation de 3,7-DHT de première génération. Dans l'objectif d'améliorer ces composés, sur la base de leur relation structure/activité, nous avons également pour projet d'obtenir la structure cristallographique d'un complexe ternaire RT/(matrice/amorce)/dNTP, en présence d'une 3,7-DHT. Des cristaux de différents complexes ont été obtenus, mais n'ont pas permis d'obtenir de clichés de diffraction aux rayons X et restent par conséquent à améliorer.

Nous avons également étudié l'influence de la concentration en Mg^{2+} libre sur les activités catalytiques de la RT du VIH-1.

En résumé, les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse permettent d'élaborer les prémices d'une stratégie de conception «rationalisée» d'inhibiteurs de la RT et de l'IN, dans l'objectif d'obtenir des composés plus spécifiques et plus affins de l'un ou l'autre site catalytique.

Mots clés □ Rétrovirus – VIH – Rétrotranscriptase – Intégrase - □-hydroxytropolones – Mg^{2+} - Inhibition