

## Les stratégies de recherche de molécules antirétrovirales

Le traitement du sida, outre les thérapeutiques immunologiques, passe clairement par la mise au point de molécules antirétrovirales, capables de bloquer d'une manière aussi efficace que possible une étape du cycle du virus. Les virus, en tant que parasites, utilisent largement pour leur propre réplication la machinerie anabolique cellulaire - synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines.... Le problème consiste donc à obtenir un produit sélectif, agissant sur le cycle viral sans altérer le bon fonctionnement des cellules de l'hôte. Pour cela, il est indispensable d'identifier clairement des cibles sélectives du virus et impliquées dans les étapes-clés du cycle viral. On peut distinguer deux types d'approche pour la recherche de molécules, l'approche de médicaments antirétroviraux classiques et celle s'appuyant sur le concept d'antisens.

Certaines protéines virales de même que des protéines cellulaires partenaires des protéines virales s'avèrent être des cibles potentielles. Dans le cadre de la recherche de médicaments antiviraux classiques, on peut envisager les molécules selon leur action sur les différentes étapes du cycle viral.

Quant à la stratégie antisens, elle met en jeu l'élaboration d'oligonucléotide formant des hétéroduplex avec les ARN viraux, et qui sont donc susceptibles d'intervenir à différentes étapes du cycle viral, principalement au niveau de l'expression des gènes viraux.

Le génome du VIH est constitué de neuf gènes. Trois gènes sont communs à tous les rétrovirus

- gag, qui code pour les protéines de la capsid,
- env. qui code pour les protéines d'enveloppe,
- pol, qui code pour la transcriptase inverse et l'intégrase.

Le génome du VIH est d'une complexité inhabituelle aux rétrovirus, car il contient au moins 6 gènes supplémentaires de petite taille.

Certains de ces gènes (rev, tat et nef) codent pour des protéines qui régulent l'expression des gènes viraux.

### **Cibles pharmacologiques virales et cellulaires**

#### **Transcriptase inverse**

La transcriptase inverse, enzyme virale qui catalyse la synthèse d'ADN viral à partir du génome ARN, est actuellement la seule cible pharmacologique véritablement utilisée pour combattre le VIH. L'étape de la transcription inverse conduit d'un ARN viral à un ADN double brin qui comprend de nouvelles structures, les ETR (Long Terminal Repeat), indispensables à la bonne intégration du génome viral. La transcription inverse reste l'étape la plus importante sur le plan pharmacologique. Les analogues non hydrolysables de nucléosides, AZT, ddI, ddC, 3TC et D4T, constituent la classe thérapeutique actuellement la plus développée. Sous forme triphosphorylée, ils entrent en compétition avec les nucléosides naturels et entraînent la terminaison de l'élongation de la chaîne d'ADN.

Le problème de la phosphorylation est un problème-clef dans la recherche de nouveaux analogues de nucléosides anti-VIH. La première phosphorylation est catalysée par une nucléoside kinase cellulaire, puisque le VIH n'en possède pas. Le composé monophosphate est ensuite transformé en nucléoside di- puis tri-phosphate par deux autres kinases également cellulaires. Dans le cas de l'AZT par exemple, ces deux enzymes sont de faible efficacité, ce qui entraîne une accumulation du nucléoside monophosphate dans la cellule, accumulation compensée par son excrétion rapide, ce qui contribue à diminuer encore l'efficacité de la drogue.

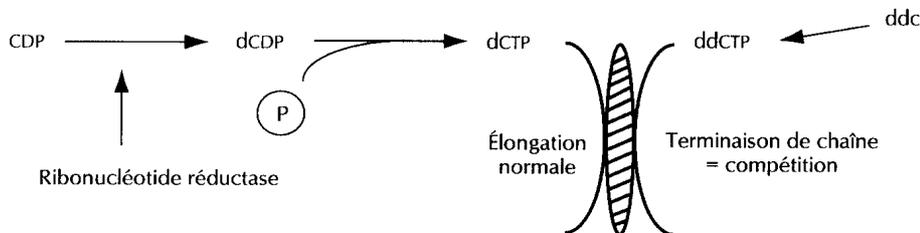
Pour évaluer les potentialités d'un analogue, il est donc important de savoir s'il sera phosphorylé et par quelle kinase il le sera. Cela peut être réalisé par des études in vitro de phosphorylation des analogues par les divers systèmes purifiés. L'autre facteur limitant l'activité antirétrovirale des analogues de nucléosides se situe au niveau de l'expression des kinases cellulaires, fonction de l'état métabolique des cellules en effet, le statut métabolique des cellules cibles en termes de réplication et d'activité transcriptionnelle conditionne l'activité antirétrovirale des analogues de nucléosides. De ce point de vue, les lymphocytes quiescents ont un état métabolique extrêmement défavorable à l'activité de ces composés. Le niveau de phosphorylation des différents substrats varie également d'une espèce à l'autre la ddC, par exemple, est bien phosphorylée dans les lignées humaines et très peu dans les lignées murines.

Afin de se libérer de cette dépendance par rapport à l'état métabolique des cellules, des composés mono-phosphorylés des molécules AZT, ddC et ddI sous forme d'esters ont été synthétisés et sont à l'étude ces ester mono-phosphates présentent un grand intérêt car ils passent très bien les membranes cellulaires.

Après action des estérases, les composés mono-phosphates sont ainsi obtenus indépendamment du niveau d'activité des kinases cellulaires. De telles prodrogues modifiées - esters monophosphates mais aussi dérivés lipophiles et molécules porteuses de radicaux diarylphosphates - font l'objet d'évaluation et de développement parfois déjà cliniques. D'autres voies de recherche sont en cours d'exploration, comme la mise au point de vecteurs d'administration ou la pharmaco-modulation contrôlée génétiquement.

Une deuxième approche consiste à associer deux molécules agissant l'une au niveau viral (inhibiteur de la transcriptase inverse), l'autre au niveau cellulaire. Au niveau cellulaire, la ribonudéotide réductase catalyse la réduction des ribonudéotides diphosphorylés (ribo-NDP) en désoxyribonudéotides (dNDP). Les dNDP sont ensuite phosphorylés en dNTP. Le flux de la biosynthèse des dNTP est le facteur limitant la synthèse d'ADN cellulaire et d'ADN viral lors de l'étape de transcription inverse.

Prenons l'exemple de la cytidine: la ribonucléotide réductase catalyse la réduction de la CDP en dCDP, qui est ensuite phosphorylée en dCTP. L'analogue nucléosidique ddc est triphosphorylé en ddCTP dans la cellule, et entre alors en compétition avec le nucléoside normal, le dCTP, pour l'incorporation dans la chaîne d'ADN. Ainsi, si l'on parvient à diminuer la biosynthèse des nucléosides endogènes normaux en inhibant la ribonucléotide réductase, on favorise alors l'incorporation des analogues de nucléoside qui entraînent la terminaison de chaîne et la formation d'ADN viral tronqué. On obtient cet effet avec l'hydroxyurée, antitumoral inhibiteur spécifique de la ribonucléotide réductase, ou avec la thymidine qui inhibe la réduction de la CDP en dCDP par un effet de rétrocontrôle d'une des sous-unités de la ribonucléotide réductase.



Cette approche expérimentale est très intéressante car elle produit un effet de potentialisation des analogues de nucléosides. Cependant, il reste nécessaire de tester la tolérance des patients à l'hydroxyurée et de vérifier son effet clinique.

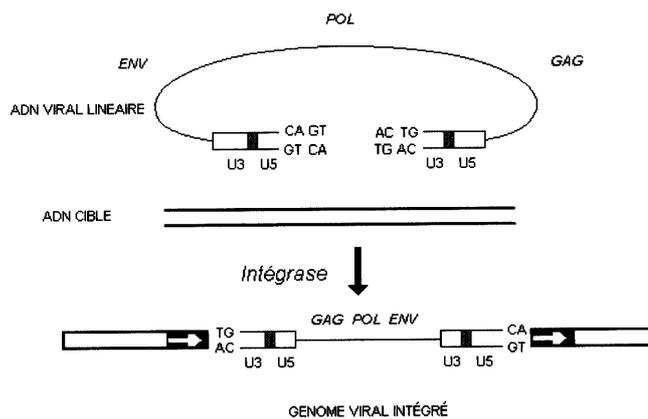
Récemment, des composés de la série des hydroxamates d'aminoacides ont également été proposés comme potentialisateurs des analogues de nucléosides et semblent également agir en inhibant la ribonucléotide réductase. Très intéressant en théorie, ce mécanisme d'inhibition reste cependant encore loin d'une application pratique optimale.

En fait, la mise en place de protocole de polychimiothérapie associant un inhibiteur de la biosynthèse des dNTP, par essence cytotoxique, avec un analogue de nucléoside reste très délicat. Néanmoins, les résultats obtenus actuellement sur la potentialisation de la ddI semblent prometteurs.

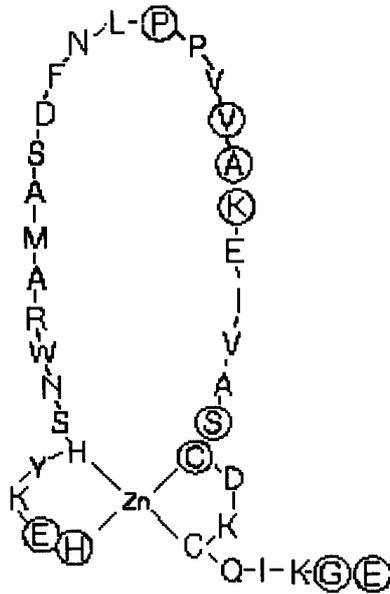
Une autre famille d'inhibiteurs de l'étape de transcription inverse sont les inhibiteurs non nucléosodiques de l'enzyme, qui agissent vraisemblablement par inhibition allostérique. Ils présentent une bonne activité in vitro mais ne semblent pas présenter d'intérêt clinique majeur, particulièrement en raison de l'apparition précoce de résistance. Un inhibiteur sélectif et très actif de la transcriptase inverse, utilisable en clinique, reste à découvrir.

### Intégrase

Dans la cellule, l'ADN viral peut se trouver sous forme linéaire ou circulaire, à une ou deux extrémités LTR (*Long Terminal Repeat*). La forme linéaire est considérée comme la forme pro-intégrative. Le processus d'intégration est indispensable à l'expression des gènes viraux et, de ce fait, est une des étapes-clés du cycle viral. Elle conditionne la progression de l'infection virale (fig. 17-1).



130 Figure 17-1 - Intégration de l'ADN rétroviral du Mo. MLV dans l'ADN cible



**Figure 17-2 – Motif en doigt de zinc de l'intégrase du VIH-**

L'intégrase, protéine de 32 KD codée par le gène pol (Panganiban et Temin, 1984), catalyse l'insertion du génome viral ADN dans le génome de la cellule cible. La structure du site de l'intégrase, qui appartient à la famille des polynucléotidyl-réductases, est connue depuis peu (Dyda et coll., 1994). La séquence primaire de la protéine présente du côté N-terminal un motif très conservé de type histidine-histidine-cystéine-cystéine (HHCC) (fig. 17-2). Comparées aux caractéristiques canoniques des motifs en doigt de zinc, celles de l'intégrase diffèrent sur trois points: l'orientation est HHCC au lieu de CCHH, la boucle liant la séquence H à la séquence C apparaît particulièrement longue (23 acides aminés) et, enfin, le motif est unique. Bien qu'indispensable à l'activité enzymatique, ce motif ne semble pas être impliqué dans la fixation de la protéine sur l'ADN.

L'intégration s'effectue en deux étapes l'une est la coupure sélective de deux nucléotides aux extrémités LTR situées sur l'ADN viral, l'autre est l'insertion de ces LTR dans l'ADN de la cellule cible.

La voie thérapeutique d'inhibition de l'étape d'intégration est encore très expérimentale en dépit de recherches actives dans ce domaine, il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de l'intégrase du VIH susceptible d'entrer en essai clinique. Le meilleur composé actif *in vitro* reste la suramine qui inhibe les deux étapes de l'intégration à des concentrations pratiquement stœchiométriques à celles de l'enzyme. La suramine présentant six charges négatives se fixe par interactions électrostatiques sur la partie N-terminale cationique de l'enzyme.

Cette fixation perturbe la fixation non spécifique de l'enzyme sur l'ADN viral. Un certain nombre de composés présentent un effet inhibiteur sur l'intégrase *in vitro*, mais à des concentrations peu compatibles avec un effet pharmacologique sélectif. Il semble cependant que des composés hétérocycliques présentant des structures de type orthadiphénols ou ortho-phénol-carboxylates soient des inhibiteurs potentiellement intéressants. Dans presque tous les cas, ces composés sont inactifs sur le cycle viral *ex vivo*. La détermination récente de la structure tridimensionnelle de la partie catalytique de l'intégrase du VIH-1 donne accès à des études structurales prédictives et rationnelles pour définir de nouveaux inhibiteurs spécifiques. Il faut enfin mentionner que l'inhibition de l'intégration peut être obtenue *in vitro* par une stratégie anti-sens, en ciblant les séquences polypurines/polypyrimidines des extrémités LTR de l'ADN viral par des oligonucléotides formant des triples hélices. Ces oligonucléotides sont actifs à des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  et inhibent le cycle vital *ex vivo* à des concentrations identiques.

### **Protéase**

Une fois traduites, les protéines virales vont s'associer au génome viral composé d'un dimère d'ARN pour produire de nouvelles particules infectieuses, qui quittent la cellule infectée par bourgeonnement au niveau de la membrane. L'étape finale de maturation des virions (assemblage de ses différents composants, constituants de la capsid, de la nucléocapsid et enzymes virales) implique une aspartyl-protéase virale, produit du gène pol. La structure tridimensionnelle de cette enzyme est connue celle-ci clive spécifiquement les liaisons Phe-Pro et Tyr-Pro, qui par contraste ne sont pas hydrolysées par les protéases des mammifères.

Les inhibiteurs peptidiques de protéases comportent une séquence peptidique analogue au substrat naturel, mais possède en P1 un acide aminé non hydrolysable il peut s'agir de peptides courts ou de peptidomimétiques. Première molécule de cette famille, le saquinavir vient de recevoir une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis. D'autres molécules prometteuses sont en développement, comme l'indinavir et le ritonavir.

Il existe également beaucoup de recherches sur des inhibiteurs non peptidiques, de faible poids moléculaire, susceptibles d'inhiber la protéase en perturbant sa structure tridimensionnelle.

### **Protéine de nucléocapsid**

Diverses protéines virales peuvent à plus long terme devenir des cibles potentielles d'agents antirétroviraux. La nucléoprotéine NCP7, par exemple, assume un rôle fondamental dans le cycle viral, comme protéine de structure, cofacteur de la transcriptase inverse et vraisemblablement dans la facilitation de l'intégration.

Par ses fonctions d'hybridase et de transfert de brins, elle assure la dimérisation et la stabilisation du génome ARN viral et participe à l'initiation de la synthèse du provirus, au cours de la phase de transcription inverse. La nucléoprotéine, dont la structure est connue, est très basique et possède deux doigts de zinc. Des prodrogues stables et de faible toxicité, capables d'inhiber cette protéine par déplétion de son cofacteur, le zinc, sont actuellement en cours de développement. L'étude de ses fonctions *in vitro* permet également d'envisager le criblage d'agents inhibiteurs spécifiques, qui pourraient, une fois identifiés et testés, être indiqués en association avec d'autres agents anti-transcriptase inverse et anti-intégrase.

### Tat et Rev

Tat et Rev, protéines de la phase précoce, sont traduites à partir d'un ARN doublement épissé.

Tat joue le rôle d'un transactivateur absolument nécessaire pour la réplication virale et l'expression des protéines de la phase tardive (gag, pol et env). De plus, il augmente la production de Rev. Tat exerce ses fonctions de transactivateur en agissant directement sur la séquence d'ARN TAR (*poly-Tat Activation Response*). Rev facilite l'exportation vers le cytoplasme et la traduction des ARN messagers contenant la séquence RRE (*Rev Responsive Element*). Rev agit également sur des séquences répressives pour lever l'inhibition de la traduction.

Phase précoce	Phases tardives
ARN doublement épissé Traduction de Tat et Rev Induction de la production de Tat et de Rev par Tat	ARN non mûré Gag/Pol ; maturation simple Env Traduction des protéines de structure dépendante de Rev

La séquence des événements peut se schématiser de la manière suivante:

### Vif (*Virion Infectivity Factor*)

Vif est une protéine de 23 kDa codée par un transcrit de 5 Kb issu d'un épissage simple régulé par Rev. Sa localisation est essentiellement cellulaire. On détecte des anticorps anti-Vif chez les patients infectés par le VIH et ceci à tous les stades de l'infection. Le phénotype associé à l'expression de la protéine Vif est parfaitement défini. Les virions n'exprimant pas cette protéine présente un caractère infectieux environ mille fois plus faible que les virions exprimant Vif. Vif semble également impliquée dans la transmission de l'infection d'une cellule à l'autre. Vif n'est pas impliquée dans la production de particules virales. Vif ne semble pas agir sur la transcription ou la traduction des protéines virales mais plutôt sur la maturation ou l'assemblage des protéines de structure. Une anomalie de l'incorporation de la protéine d'enveloppe dans le virion a été observée dans des virus présentant une mutation de Vif. Ceci se traduit pas des anomalies de l'architecture nucléoprotéine, ce qui peut perturber des événements tels que la décapsidation ou le début de la transcription inverse.

Un fait intéressant est que la dépendance de Vif est conditionnée par le phénotype de la cellule cible. Vif est indispensable pour la réplication du virus dans certaines lignées cellulaires, dont les lymphocytes circulants, mais ne l'est pas dans d'autres. Il reste des inconnues sur la structure et la fonction de Vif, en particulier sur l'association de sa partie C-terminale avec des protéines de la membrane plasmique et sur la fonction de ses séquences conservées 103-115 et 142-150.

### ***Vpr (Viral Protein R)***

Vpr est une protéine de 14 kDa qui confère un avantage de réplication significatif pour les virus qui l'expriment. Cet effet, négligeable dans les cellules en voie de multiplication active devient important dans les monocytes et macrophages en phase G<sub>0</sub>. Les virions exprimant Vpr présentent un cycle réplcatif plus rapide et la production de particules est elle-même légèrement augmentée. Cette augmentation de production est nettement prononcée pour HIV-1 et HIV-2 dans les macrophages. Parmi toutes les protéines accessoires, Vpr est la seule qui soit incorporée dans le virion, probablement par une interaction avec le précurseur Gag p55 et la protéine p6. L'association de Vpr avec le virion indique clairement son niveau d'intervention dans les étapes précoces du cycle viral. On envisage que Vpr pourrait agir au niveau des étapes de transcription inverse, de translocation ou d'intégration en stabilisant les structures de type ADN-ARN ou ADNADN. Un effet de Vpr à l'étape de préintégration a été suggéré récemment en l'identifiant comme composant nadéophile participant avec la protéine de matrice Gag p17 au transport vers le noyau du complexe préintégratif dans les macrophages à l'état stationnaire. Dans les cellules infectées, Vpr a une localisation essentiellement nucléaire. Vpr semble interagir spécifiquement avec une protéine cellulaire et est transportée vers le noyau selon un mécanisme différent de celui observé en présence d'un signal de localisation. Vpr pourrait enfin agir également en transactivant modérément le LTR et augmenter ainsi le niveau de l'expression des gènes viraux.

La question de l'éventuelle formation d'un hétérodimère " leucine zipper " avec une protéine cellulaire reste non résolue.

### ***Vpu (Viral Protein U)***

Vpu est une protéine de 16 kDa exprimée par HIV-1 et non exprimée par HIV-2. Son principal effet semble se situer au niveau de la production de particules virales en augmentant la vitesse d'expulsion des particules virales de la membrane cellulaire. L'absence de Vpu se traduit par la production de virus d'architecture anormale et par le bourgeonnements de virions dans des vacuoles intracellulaires. L'expression de Vpu est associée à une réduction de la formation de syncytia, probablement en relation avec la vitesse d'expulsion des particules virales.

Il a été montré récemment que Vpu dégrade d'une manière spécifique le récepteur CD4 au niveau du réticulum endoplasmique. Des séquences sensibles à Vpu semblent présentes dans la partie cytoplasmique du récepteur CD4. L'effet de Vpu se situe cependant essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique. La phosphorylation de deux résidus sérine (52 et 56) affectent l'activité de Vpu. En fait, la phosphorylation affecte partiellement l'effet sur la production de virions au niveau membranaire mais est absolument indispensable à la dégradation du récepteur CD4. Il est intéressant de noter que sur le plan structural et biochimique, Vpu présente des analogies avec la protéine M2 du virus influenza. Comme la protéine M2, Vpu est capable de se multimériser au niveau membranaire.

### **Nef (*Negative Factor*)**

Nef est une protéine de 25 kDa pouvant se trouver sous une forme myristylée de 27 kDa. Le gène codant pour Nef est localisé à l'extrémité 3' du génome viral et recouvre partiellement le début du LTR U3. Il existe quelques zones très conservées dans la séquence de Nef une séquence signal de myristylation à la partie N-terminale, une séquence répétée de praline (PXX)<sub>4</sub> flanquée de résidus acides et une séquence de 30 acides aminés (120-150).

Comme Tat et Rev, Nef est exprimée précocement. Cependant, cette protéine n'a pas d'effet notable sur la réplication virale in vitro. Initialement, Nef était considéré comme un élément de régulation négatif de l'expression des gènes viraux agissant éventuellement sur l'activation transcriptionnelle du LTR. A cause de la très grande variabilité de la séquence de Nef, de nombreuses controverses sont apparues concernant les effets de cette protéine. Actuellement, un certain nombre de faits semblent être acquis. Nef semble avoir une action facilitatrice de la réplication virale en particulier dans des lymphocytes primaires infectés en phase Go puis stimulés après infection. De plus, des mutants Nef du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ne peuvent développer un effet pathogène que s'ils sont capables d'effectuer une réversion de leur mutation. Nef induit également l'internalisation et la dégradation des récepteurs CD4. La courte queue intracytoplasmique de 38 acides aminés du récepteur CD4 est indispensable à l'effet de Nef. La myristylation de Nef d'autre part est indispensable à l'interaction avec le récepteur CD4. En diminuant le nombre de CD4, Nef inhibe la surinfection des cellules et facilite la dissémination de particules virales plutôt qu'elle ne facilite la réinfection des cellules.

L'interaction avec une sérine protéine kinase cellulaire est à démontrer. D'autre part, la fonction des séquences conservées reste à être identifiée. En résumé, les perspectives pharmacologiques se situant au niveau des protéines virales se présentent d'une manière très différente en fonction des protéines concernées. Dans le cas de Tat, Rev, NcP7 et de l'intégrase, on peut raisonnablement espérer obtenir des inhibiteurs spécifiques dans les cinq ans à venir.

Cela provient du fait que, d'une part, l'on connaît relativement bien les fonctions biologiques de ces protéines et que, d'autre part, leur structure tridimensionnelle complète ou partielle est connue. Dans le cas de la protéine de matrice p17 et de la protéine du core p24, la situation est moins favorable. Les structures ne sont pas déterminées et les tests pharmacologiques inexistantes. Ces protéines sont cependant des cibles potentielles devant être explorées. Enfin, dans le cas de Nef, Vif, Vpr voire Vpu, la situation est véritablement défavorable. Les fonctions biologiques de ces protéines restent ambiguës et leur structure encore plus mal connue. Seules des recherches à long terme pourront conduire à un éventuel ciblage pharmacologique.

### **Protéines cellulaires partenaires**

L'étude des protéines cellulaires partenaires des composants viraux devient actuellement une voie de recherche importante pour déterminer de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi, plusieurs protéines ont été identifiées comme tenant des rôles parfois majeurs au cours du cycle de réplication virale.

Il existe à n'en pas douter des effecteurs protéiques cellulaires agissant au niveau des étapes précoces du cycle des rétrovirus. Ces effecteurs peuvent agir soit au niveau de l'étape mal connue de la décapsidation, soit au niveau du processus d'intégration. Concernant l'intégration, quelques éléments de réflexion peuvent être proposés. Deux protéines semblent pouvoir être considérées comme des effecteurs potentiels de l'intégration. Il s'agit de la polyADP-ribose polymérase et de la topoisomérase II. La première protéine, par ces propriétés d'interaction avec les histones, module l'accessibilité génomique qui semble être l'un des éléments déterminants de l'efficacité de l'intégration des génomes viraux. Son action est couplée avec les mécanismes de réparation de l'ADN. Cet aspect devrait faire l'objet de recherches actives à court terme. La topologie de l'ADN génomique de la cellule semble également être un paramètre important dans le contrôle de l'intégration des génomes viraux. Il a été observé que l'intégration de rétrovirus recombinants de type MoMLV était pratiquement nulle dans des lignées cellulaires sous-exprimant l'isoforme  $\alpha$  de la topoisomérase II.

Récemment, la protéine In1 (*Integrase Interacting protein 1*) a été identifiée grâce au système de criblage en double-hybride comme se liant à l'intégrase. Elle ferait probablement partie du complexe de préintégration et interviendrait dans la sélection des sites nucléiques pour l'intégration de l'ADN viral.

Etant donné les rôles potentiels de la protéine Nef dans le phénomène d'endocytose des récepteurs CD4 et dans l'augmentation de la production des particules virales par les cellules infectées, des recherches ont été menées visant à identifier ses partenaires cellulaires.

Identifiée également en système double-hybride, la protéine  $\beta$ -COP impliquée dans le transport intracellulaire des composants membranaires, semble interagir avec Nef (Benichou et coll., 1994).

Le repliement de la protéine Gag lors de l'assemblage des particules infectieuses semble requérir l'intervention d'une protéine cellulaire connue, la cyclophiline A. Inhiber cette protéine, cible de la ciclosporine A, pourrait concourir à limiter la production de particules virales infectieuses. Des inhibiteurs dérivés de la ciclosporine A, dénués toutefois d'activité immunosuppressive, font actuellement l'objet de recherches (Franke et coll., 1994).

Une autre protéine, la TDP-43, a récemment été identifiée comme interagissant avec des motifs TAR sur la molécule d'ADN viral (Ou et coll., 1995). Cette protéine serait capable de bloquer l'assemblage de complexes de transcription impliqués dans l'activation effectuée par Tat.

Les inhibiteurs de glycosydases cellulaires, largement expérimentés *in vitro*, semblent d'application très limitée *in vivo*, mais de nouvelles séries sont à l'étude.

D'un point de vue pharmacologique, l'identification de cibles cellulaires dans le but d'inhiber le cycle viral pose le problème de la sélectivité de l'effet. Il n'est pas exclu cependant que des polychimiothérapies associant des concentrations subtoxiques de composés actifs sur des cibles cellulaires à des antiviraux spécifiques puissent avoir un intérêt thérapeutique.

### **Stratégie antisens**

Une autre voie d'approche de l'inhibition du cycle de réplication virale consiste à inhiber l'expression des gènes viraux. On peut ainsi avoir recours à une stratégie dite " antisens ", qui consiste à agir sur la transcription ou sur la traduction des acides nucléiques, par différents moyens.

- Des oligomères complémentaires des ARN messagers viraux peuvent perturber la traduction. Le GEM 91 (phosphorothioate) est un oligomère antisens (25 bases complémentaires d'une séquence du gène viral gag). Il empêche la synthèse de la protéine virale en formant un hétéroduplex avec l'ARN messager. Théoriquement, il peut également s'hybrider au génome du virus, bloquant ainsi ou limitant l'action de la transcriptase inverse et peut-être l'encapsidation. Le GEM 91, qui fait l'objet d'un essai de toxicité (phase I), se révèle bien toléré. Les effets virologiques des phosphorothioates paraissent actuellement très limités. Cependant, leur stabilité pourrait être améliorée par la formation de phosphodiester protégés contre les nucléases, qu'il conviendra de tester. D'autre part, la " vectorisation " de ces composés pourrait être un autre moyen d'augmenter leur stabilité et d'améliorer leur biodisponibilité. Des travaux importants de galénique restent à faire dans ce domaine.

Il faut noter que les phosphorothioates ont par ailleurs un effet antiviral de type “ polyanion ” en interagissant de manière non spécifique avec la membrane plasmique et diverses protéines.

Différentes voies peuvent théoriquement être envisagées pour inhiber la transcription des gènes viraux.

- Il est possible de recourir à des anti-sens ADN, natifs ou modifiés, d'anométrie  $\beta$  ou  $\alpha$ . Ces ADN, généralement courts (20 à 30-mer), forment avec la séquence ARN-cible un hétéroduplex, suivi probablement par une dégradation subséquente du brin ARN par la RNase H. sauf dans le cas des ADN  $\alpha$  qui donnent des hétéroduplex insensibles à cette enzyme.

- On sait que les facteurs transcriptionnels cellulaires, notamment NF $\kappa$ B, régulent le niveau d'expression des gènes viraux. Une action à ce niveau, par exemple par “ piégeage ” du facteur transcriptionnel NF $\kappa$ B, a été envisagée. La stratégie antisens reste l'approche la plus prometteuse en la matière.

Il est envisageable de cibler les ARN au niveau nucléaire, sur les sites d'épissage, ou au niveau cytoplasmique, par exemple sur le site d'initiation de la traduction.

- Le gène *tat* est une bonne cible, car son produit exerce une double action, intracellulaire (régulatrice de l'expression virale et de la réplication) et extracellulaire (transactivatrice dans le sarcome de Kaposi). Différentes séquences peuvent être ciblées la région de transactivation de *tat* et la séquence acceptrice d'épissage.

- L'interaction entre la protéine Rev et sa cible sur l'ARN viral (RRE: *Rev Responsive Element*), et par conséquent les étapes de transcription dépendantes de Rev, peuvent être diminuées en présence d'un oligodésoxynucléotide antisens compétiteur de la séquence RRE.

- Dans la stratégie triple hélice (ou anti-gène), l'oligonucléotide se fixe sur l'ADN et par formation locale d'une triple hélice, empêche la transcription d'un gène. Différents sites du gène peuvent être choisis pour cibles, selon que l'on désire inhiber la fixation de facteurs de transcription ou empêcher l'initiation ou l'élongation de l'ARN messager transcrit. Les oligonucléotides triple hélice, qui ciblent les séquences LTR très conservées de l'ADN viral, sont très efficaces in vitro dans l'inhibition de l'intégration et présentent une bonne sélectivité. Ils constitueraient actuellement le seul moyen d'éliminer un provirus intégré dans une cellule.

Par ailleurs, les triples hélices peuvent être utilisées comme anti-messagers lorsque ceux-ci forment une structure en épingle en cheveux.

Les ribozymes sont quant à eux des oligoribonucléotides possédant des structures tridimensionnelles particulières, contenant une séquence consensus à activité nucléasique. Après leur fixation, ces structures sont capables de River l'ARN messenger.

La stratégie anti-sens constitue une approche nouvelle en thérapeutique humaine, puisqu'il s'agit d'utiliser un acide nucléique comme médicament, sur une cible qui, elle-même, est un acide nucléique et non plus une protéine. Les essais qui viennent d'avoir lieu ont été les premiers à utiliser un antisens par voie générale chez l'homme, quelle que soit la pathologie concernée.

Les deux problèmes majeurs de la " stratégie antisens " sont d'une part la stabilité des oligonucléotides et d'autre part le ciblage d'une séquence d'ARN appropriée. Une deuxième stratégie consiste à faire synthétiser dans la cellule un ARN antisens vrai (beaucoup plus long) par exemple en introduisant un vecteur rétroviral qui code pour l'anti-messenger. Il est possible de déterminer les séquences devant être ciblées par criblage systématique en utilisant la technique des *genetic suppressor elements* (OSE). Cette approche relève cependant de la thérapie génétique et non de la pharmacologie.

En résumé, se dégage une série de pistes qui, sans avoir toujours d'application immédiate, représente à court, moyen ou long terme des espoirs sérieux. Les pistes plus accessibles semblent porter sur des inhibiteurs de protéines virales, intégrase, Rev, Tat et nucléocapside.

## **BIBLIOGRAPHIE**

ANTONUCCI T, WARMUS JS, HODGES JC, NICKEU DG. Characterization of the antiviral activity of highly substituted pyrroles: a novel class of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1995, **6**: 98-108

BARAT C, SCHATZ O, LE GRICE S, DARLIX JL. Analysis of the interactions of HIV-1 replication primer tRNA Lys, 3 with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *J Mol Biol* 1993, **231**: 185-190

BAYER P, KRAFT M, EJCHART A, WESTEN DORP M, FRANK R, ROSCH P. Structural studies of HIV-1 tat protein. *J Mol Biol* 1995, **247**: 529-535

BEEN-TIKTAK AMM, VREHEN HM, SCHNEIDER MME, VAN DER FELTZ M, BRANGER T, WARD P, COX SR, HARRY JD, BORLEFFS JCC. Safety, tolerance and pharmacokinetics of atevirdine mesylate (U 87201E) in asymptomatic human immunodeficiency virus. infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 **39**: 602-607

BENICHOUS S, BOMSEL M, BODEUS M, DURAND H, DOUTE M, LETOURNEUR F, CAMOMIS J, BENAROUS R. Physical interaction of the HIV-1 nef protein with  $\beta$ -COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem* 1994, **269**: 30073-30076

BERKHOUT B, VAN WAMEL JLB. Inhibition of human immunodeficiency virus expression by sense transcripts encoding the retroviral leader RNA. *Antiviral Res* 1995, **26**: 101-115

BERTRAND E, PICTET R, GRANGE T. Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Research* 1994, **22**: 293-300

BILLICHA A, HAMMERSCHMID F, PEICHL P, WENGER R, ZENKE G, QUESNIAUX V, ROZENWIRTH B. Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J Virol* 1995, **69**: 2451-2461

BONNAFFE D, DUPRAZ B, UGHETTO-MONFRIN J, NAMANE A, HUYNH DINH T. Synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs containing two inhibitors targeted against different phases of the HIV replication cycle. *Nucleosides and Nucleotides*. 1995, **14**, 3-5, 783-785

BORMAN AM, QUILLET C, CHARNEAU P, DAUGUET C, CLAVEL F. Human immunodeficiency virus type 1 vif mutant particles from restrictive cells: role of vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol* 1995, **69**: 2058-2067

BRENNANT TM, TAYLOR DL, BRIDGES CG, LEYDA JP, TYMS AS. The inhibition of human immunodeficiency virus type I in vitro by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor MKC-442, alone and in combination with other anti-HIV compounds. *Antiviral Res* 1995, **26**: 173-187

BRESLIN HJ, KLUKA MJ, LUDOVICI DW, MOHRBACHER R, HO W, MIRANDA M, RODGERS JD, HITCHENS TK, LEO G, GAUTHIER DA, HO CY, SCOTT MK, DE CLERCO E, PAUWELS R, ANDRIES K, JANSSEN MAC, JANSSEN PA. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4, 5, 6, 7-tetrahydro-5-methylimidazo-[4, 5, 1jk] [1,4] benzodiazepin-2(1H)-one (T1BO) derivatives (3). *J Med Chem* 1995, **38**: 771-793

BUKRINSKY MI, HAGGERTY S, DEMPSEY MP, SHAROVA N, ADZHUBEL A, SPITZ L, LEWIS P, GOLDFARB D, EMERMAN M, STEVENSON M. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993, **365**: 666-669

BUSHMAN F. Targeting retroviral integration. *Science* 1995, **267**: 1443-1444

CHANG HK, GENDELMAN R, LISZLEWICZ J, GALLO RC, ENSOL B. Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. *Gene Therap*, 1994, **1**: 208-216

CHIRMULE N, THAN S, KHAN SA, PAHWA S. Human immunodeficiency virus Tat induces functional unresponsiveness in T-cells. *J Virol* 1995, **69**: 492-498

CHOWERS MY, SPINA CA, KWOH TJ, FITCH NJS, RICHMAN DD, GUATELLI JC. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 1994, **68**: 2906-2914

COATES K, HAMIS M. The human immunodeficiency virus type 1 nef protein functions as a protein kinase C substrate in vitro. *J Gen Virol* 1995, **76**: 837-344

CONDRA JH, SCHLEIF WA, BLAHY OM, GABRYELSKI Y, GRAHAM DJ, QUNITERO JC, RHODES A, ROBBINS HL, ROTH E, SHIVAPRAKASH M, TOTUS D, YANG T, TEPPLER H, SQUIRES KE, DEUTSCH PJ, EMINI EA. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995, **374**: 569-571

CONNEL EV, HSU MC, RICHMAN DD. Combinative interactions of a human immunodeficiency virus (HIV) Tat antagonist with HIV reverse transcriptase inhibitors and an HIV protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, **38**: 348-352

CULLEN BR, HEITMAN J. Chaperoning a pathogen. *Nature* 1994, **372**: 319-320

CUPELLI LA, HSU MC. The human immunodeficiency virus type 1 tat antagonist, Ro 5-3335, predominantly inhibits transcription initiation from the viral promoter. *J Virol* 1995, **69**: 2640-2643

DARLL JL, VINCENT A, GABUS C, DE ROCQUIGNY H, ROQUES B. Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV 1 RNA. *C R Acad Sci* 1993, **316**: 763-771

DONG CZ, JULLIAN N, YANG YS, DE ROCQUIGNY H, FOURNIE-ZALUSKI MC, ROCQUES BP. Synthesis and conformational studies of a cyclic analog of the proximal zinc finger of HIV-1 NCP7 for antibody generation. *J Am Chem Soc* 1995, **117**: 2726-2731

DUDLEY MN. Clinical pharmacokinetics of nucleoside antiretroviral agents. *J Infect Dis* 1995, **171** Suppl. 2: 99-112

FLETCHER RS, SYED K, MITHANI S, DMITRIENKO GI, PARNIAK MA. Carboxanilide derivative non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase interact with different mechanistic forms of the enzyme. *Biochemistry* 1995, **34**: 4346-4353

FRANKE EA, YUAN HEH, LUBAN J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-virions. *Nature* 1994, **372**: 359-362

FRIDELL RA, H ARDING LS, BOGERD HP, CULLEN BR. Identification of a novel human zinc finger protein that specifically interacts with the activation domain of lentiviral tat proteins. *Virology* 1995, **209**: 347-357

GALLAY P, SWINGLER S, ALKEN C, TRONO D. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 1995, **80**: 379-388

GAO WY, CARA A, GALLO RC, LORI E. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Med Sci* 1993, **90**: 8925-8928

GIAMMONA G, PUGLISI G, GAVALLORA G, SPADARO A, PITARRESI G. Chemical stability and bioavailability of acyclovir coupled to a, b-poly (N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide. *Journal of Controlled Release* 1995, **33**: 261-271

GOLDFARB DS. Simply marvelous nuclear transport. *Current Biology* 1995, **5**: 570-573

GUDIMA SO, MEMELOVA LV, BORODULIN VB, POKHOLOK DK, MEDNIKOV BM, TOLKACHEV ON, KOCHETROV SN. Kinetic analysis of interaction of human immunodeficiency virus reverse transcriptase with some alkaloids. *Molecular Biology* 1995, **28**: 809-812

HARVIE P, DESORMEAUX A, GAGNE N, TREMBLAY M, POULIN L, BEAUCHAMP D, BERGERON MG. Lymphoid tissues targeting of liposome-encapsulated 2', 3'-dideoxyinosine. *AIDS* 1995, **9**: 701-707

HEINZINGER NK, BUKRINSKY MI, HAGGERTY SA, RAGLAND AM, KEWALRAMANI V, LEE MA, GENDELMAN HE, RATNER L, STEVENSON M, EMERMAN M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Biochem* 1994, **91**: 7311-7315

Ho W, KUKLA MJ, BRESUN H], LUDOVICI DW, GROUS PP, DIAMOND CJ, MIRANDA M, RODGERS JD, HO CY, DE CLERCQ E, PAUWELS R, ANDRIES K, JANSSEN MAC, JANSSEN PAJ. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4, 5, 6, 7-tetrahydro-5-methylimidazo-[4,5,1j]1,4] henzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) derivatives (4). *J Med Chem* 1995, **38**: 794-802

HOSTETLER KY, RICHMAN DD, FORSSEN EA, SELK L, BASAVA R, GARDNER MF, PARKER S, BASAVA C. Phospholipid prodrug inhibitors of the HIV protease. Antiviral activity and pharmacokinetics in rats. *Biochem Pharmacol* 1994, **48**: 1399-1404

HUANG LM, IOSHI A, WILLEY R, ORENSTEIN J, JEANG KT. Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans-activators: genetic evidence for a novel nontranscriptional function of tat in virion infectivity. *EMBO Journal* 1994, **13**: 2886-2896

JONES RJ, BISCHOFBERGER N. Minireview: nucleotide prodrugs. *Antiviral Res* 1995, **27**: 1-17

KALPANA GV, MARMON S, WANG W, CRABTREE GR, GOFF SP. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 1994, **266**: 2002-2005

KAPPES JC, PARKIN JS, CONWAY JA, KIM J, BROUILLETTE CG, SHAW GM, HAHN BH. Intracellular transport and virion incorporation of vpx requires interaction with other virus type-specific components. *Virology* 1993, **193**: 222-233

KAUL S, MUMMANENI V, BARBHAIYA RH. Dose proportionality of stavudine in HIV seropositive asymptomatic subjects: application to bioequivalence assessment of various capsule formulations. *Biopharm Drug Dispos* 1995, **16**: 125-136

KAWAMURA M, SAKAI H, ADACHI A. Human immunodeficiency virus Vpx is required for the early phase of replication in peripheral blood mononuclear cells. *Microbiol Immunol* 1994, **38**: 871-878

KUIPERS ME, SWART PJ, HENDRIKS MMWB, MEIJER DKF. Optimization of the reaction conditions for the synthesis of neoglycoprotein-AZT-monophosphate conjugates. *J Med Chem* 1995, **38**: 883-889

KUMAR R, WANG L, WIEBE LI, KNAUS EE. Synthesis and antiviral (HIV-1, HBV) activities of 5-halo-6-methoxy(or azido)-5,6-dihydro-3'-fluoro-3'-deoxythymidine diastereomers. Potential prodrugs to 3'-fluoro-3'-deoxythymidine. *J Med Chem*. 1994, **37**: 3554-3560

KUMAR R, WANG L, WIEBE LI, KNAUS EE. Synthesis, in vitro biological stability, and anti-IV activity of 5-halo-6-alkoxy(or azido)-5,6-dihydro-3'-azido-3'-deoxythymidine diastereomers as potential prodrugs to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). *J Med Chem* 1994, **37**: 4297-4306

LI CJ, FRIEDMAN DI, WANG C, METELEV V, PARDEE AB. Induction of apoptosis in infected lymphocytes by HIV-1 tat protein. *Science* 1995, **268**: 429-431

LI G. LISZIEWICZ J. SUN D, ZON G. DAEFLER S. WONG-STAAAL E. GALLO RC, KLOTMAN ME. Inhibition of rev activity and human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate analogs directed against the rev responsive element. *J Virol* 1993, **67**: 6882-6888

LISZIEWICZ J. SUN D, WEICHHOLD EF, THIERRY AR, LUSSO P. TANG J. GALLO RC, AGRAWAL S. Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Med Sci* 1994, **91**: 7942-7946

LORI E. MALYKH A, CARA A, SUN D, WEINSTEIN JN, LISZIEWICZ J. GALLO RC. Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. *Science* 1994, **266**: 801-805

MAKABI-PANZU B. LESSARD C, BEAUCHAMP D, DESORMEAUX A, POULIN L, TREMBLAY M, BERGERON MG. Uptake and binding of liposomal 2', 3'-dideoxycytidine by RAW 264.7 cells: a three-step process. *J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirology* 1995, **8**: 227-235

MANKERTZ J. VON BAEYER H. ROKOS K. NUNDEL M, PAULI G. RIEDEL E. Cell specific uptake of antiretroviral drugs: AZT coupled to LDL inhibits HIV replication in human macrophages. *Int J Clin Pharmacol Therapeutics* 1995, **33**: 85-88

MATTEWS S. BARLOW P. BOYD J. BARTON G. RUSSEL L, MILLS H. CUNNINGHAM M, MEYERS N. BURNS N. CLARK N. KINGSMAN S. KINGSMAN A, CAMPBELL L Structural similarity between the p17 matrix protein of HIV-1 and interferon. *Nature* 1994, **370**: 666

MAYAUX S. BOUSSEAU A, PAUWEL S. HUET T, HENIN Y, DEREU N. EVERS M, SSOLER F. POUJADE C, DE CLERCQ E. LE PECQ JB. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad USA* 1994, **91**: 3564-3568

MCGUIGAN C, DAVIES M, PATHIRANA R. MAHMOOD N. HAY AJ. Synthesis and anti-HIV activity of some novel diaryl phosphate derivatives of AZT. *Antiviral Res* 1994, **24**: 69.-77

MEYERHANS A, VARTANIAN JP, HULTGREN C, PLIKAT U. KARLSSON A, WANG L, ERIKSSON S. WAIN-HOBSON S. Restriction and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication by modulation of intracellular deoxynucleoside triphosphate pools. *J Virol* 1994, **68**: 535-540

MICHAELS EH, HATTORI N. GALLO RC, FRANCHINI G. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vif protein is located in the cytoplasm of infected cells and its effect on viral replication is equivalent in HIV-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993, **9**: 1025-1030

MILLER MD, BUSHMAN ED. Ini1 for integration ? *Current Biology* 1995, **5**: 368-370

MILLER MD, WARMERDAM MT, PAGE KA FEINBERG MB, GREENE WC. Expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef gene during HIV-1 production increase progeny particle infectivity independently of gp 160 or viral entry. *J Virol* 1995, **69**: 579-584

O'BRIEN C HIV integrase structure catalyzes drug search *Science* 1994,**266**: 1946-1946

OU SH , WU F. HARRICH D, GARCIA-MARTINEZ LF, GAYNOR R B. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 1995, **69**: 3584-3596

PANGANIBAN AT, TEMIN HM. The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **81**: 7885-7889

PARK IW, MYRICK K, SODROSKI J. Effects of vif mutations on cell-free infectivity and replication of simian immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994, **7**: 1228-1236

PARK IW, SODROSKI J. Functional analysis of the vpx, vpr, and nef genes of simian immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr and Human Retrovirology* 1995, **8**: 335-344

PIRRUCCELLO SJ, PERRY GA, BOCK PJ, LANG MS, NOEL SM, ZON G. IVERSEN PL. HIV-1 rev antisense phosphorothioate oligonucleotide binding to human mononuclear cells is cell type specific and inducible. *Antisense Res Dev* 1994, **4**: 285-289

PRIEL E, AFLALO E, SERI I, HENDERSON LE, ARTHUR LO, ABOUD M, SEGAL S, BLAIR DG. DNA binding properties of the zinc-bound and zinc-free HIV nucleocapsid protein: supercoiled DNA unwinding and DNA-protein cleavable complex formation. *FEBS letters* 1995, **362**: 59-64

REFAELI Y, LEVY DN, WEINER DB. The glucocorticoid receptor type II complex is the target of the HIV-1 vpr gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 3621-3625

REICH SH, MELNICK M, DAVIES II JF, APPELT K, LEWIS KK, FUHRY MA, PINO M, TRIPPE AJ, NGUYEN D, DAWSON H, WU BW, MUSICK L, KOSA M, KAHIL D, WEBBER S, GEHUHAAR DK, ANDRADA D, SHETTY B. Protein structure-based design of potent orally bioavailable, nonpeptide inhibitors of human immunodeficiency virus protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 3298-3302

RICHMAN DD. Playing chess with reverse transcriptase. *Nature* 1993, **361**: 588-589

RICHMAN D. Protease uninhibited. *Nature* 1995, **374**: 494-494

ROGEL ME, WU U, EMERMAN M. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 1995, **69**: 882-888

ROSE JR, BABEL LM, CRAIK Cs. Defining the level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity. *J Virol* 1995, **69**: 2751-2758

SALASKI EJ. Synthesis of imidazobenzazepinones: a new series of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Tetrahedron letters* 1995, **36**: 1387-1390

SALGHETTI S, MARIANI R, SKOWRONSKI J. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56(lck) protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 349-353

SARIN PS, GOU)STEIN AL Treatment of AIDS with drugs targeted to inhibit different stages of the HIV life cycle. *Immunopharmac Immunotoxicol* 1995, **17**: 217-245

SAWAI ET, BAUR A, STRUBLE H, PETERUN BM, LEVY JA, CHENG-MAYER C. Human immunodeficiency virus type 1 nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**: 1539-1543

SCHWARTZ O, DAUTRY VARSAT A, GOUD B, MARECHAL V, SUBTIL A, HEARD JM, DANOS O. Human immunodeficiency virus type 1 nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J Virol* 1995, **69**: 528-533

SOBOL RW, HENDERSON EE, KON N. SHAO J. HITZGES P. MORDECHAL E. REICHENBACH NL, CHARUBALA R. SCHIRMEISJER H. PFEIDERER W. SUHADOLN}K RJ. Inhibition of HIV-1 replication and activation of RNase L by phosphorothioate/phosphodiester 2', 5'-oligoadenylate derivatives. *J Biol Chem* 1995, **270**: 5963-5978

SOUTHGATE CD, GREEN MR. Delineating minimal protein domains and promoter elements for transcriptional activation by lentivirus tat proteins. *J Virol* 1995, **69**: 2605-2610

SPENCE RA, KATI WM, ANDERSON KS, JOHNSON KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 1995, **267**: 988-993

SPINA CA, KWOH TJ, CHOWERS MY, GUATELU JC, RICHMAN DD. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med* 1994, **179**: 115-123

STUTZ F. NEVIULE M, ROSBASH M. Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 rev protein in yeast. *Cell* 1995, **82**: 495-506

THALI M, BUKOVSKY A, KONDO E. ROZENWIRTH B. GOTTUNGER HG. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 1994, **372**: 363-365

TORTOLANI DR, RUSSEL JW, WHITEROCK VJ, HITCHCOCK MJ, GHAZOUU I, MARTIN JC, MANSOURI MM, STARRETT JE JR. Prodrugs of 2', 3'-didehydro-3' deoxythymidine (D4T): synthesis, antiviral activity, and rapid pharmacokinetics evaluation. *J Pharm Sci* 1994, **83**: 339-343

TRONO D. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* 1995, **82**: 189-192

TUMMINO PJ, FERGUSON D, JACOBS CM, TAIT B. LUNNEY E. HUPE D. Competitive inhibition of HIV-1 protease by biphenyl carboxylic acids. *Arch Biochem Biophys* 1994, **316**: 523-528

VAN WIJK GMT, HOSTETLER KY, KRONEMAN E. RICHMAN DD, SRIDHAR CN, KUMAR R. VAN DEN BOSH H. Synthesis and antiviral activity of 3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate distearoylglycerol: a novel phospholipid conjugate of the anti-HIV agent AZT. *Chem. Phys Lipids* 1994, **70**: 213-222

ZELPHATI O, DEGOLS G. LOUGHREY H. LESERMAN L, POMPON A, PUECH F. MAGGIO AF, IMBACH JL, GOSSEUN G. Inhibition of HIV 1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes. *Antiviral Res* 1993, **21**: 181-195

ZHAO y, WANG 11, MUKHERJEE S. NARAYAN O. Biochemical mechanism of HIV-I Vrp function-Oligomerization by the N-terminal domain. *J Biol Chem.* 1994, **269**: 32131-32137