

A propos des inhibiteurs de la protéine Tat : cible moléculaire de choix dans l'inhibition de la réplication du HIV

Dans l'excellente mise au point sur les traitements du SIDA parue dans le numéro d'octobre de *médecine/sciences* [1], le professeur Jean-Paul Lévy note avec intérêt, en ce qui concerne les inhibiteurs de la protéine Tat, qu'« un produit issu du criblage systématique et supposé avoir une action anti-Tat pourrait (...) apparaître à brève échéance »...

Cela vient d'être confirmé par un résultat important, présenté dans une communication à la *Fourth International Conference on Antiviral Research* (New Orleans, LO, USA, avril 1991) et repris plus en détail récemment dans une publication parue dans *Science* [2]. Les chercheurs d'Hoffman la Roche Inc., en collaboration avec Richman (Medical center, San Diego, CA, USA), Potash et Volsky (St Luke's Roosevelt Hospital, New York, NY, USA), grâce à la mise au point d'un test anti-Tat, ont réalisé un criblage à l'aveugle sur un très grand nombre de composés dont l'un, le RO-5-3335, une benzodiazépine (!), s'est révélé particulièrement efficace *in vitro* (figure 1).



Figure 1. Le RO 5-3335 (7-chloro-5-(2-pyrryl)-3H-1,4-benzodiazépin-2(H)-one) une tête de file, dans la recherche des inhibiteurs de la protéine Tat ?

Pourquoi un tel intérêt ? Rappelons que l'expression du HIV est contrôlée par un certain nombre de protéines, dont les protéines Tat et Rev, qui participent au réveil et à la dissémination du virus. La protéine Tat joue, notamment, un rôle déterminant dans l'expression du HIV, après avoir été synthétisée dans le cytoplasme et ce par lecture de l'ARNm correspondant, par les ribosomes et les ARNt de la cellule hôte.

L'activité de cette protéine est considérable et l'on a pu montrer que les cellules infectées par du HIV mutant, dépourvu de gène *tat* produisaient 1 000 fois moins de gènes viraux que les cellules infectées où la protéine Tat était présente. Ainsi, un inhibiteur de Tat maintiendrait le virus à l'état « dormant » et pourrait être utilisé pour traiter des patients ARC (*aids-related complex*, ensemble de symptômes précédant l'apparition du SIDA) ou SIDA.

Le mécanisme d'action de la protéine Tat est de type bimodal : elle est un puissant régulateur positif de la transcription virale ADN → ARNm et a aussi pour fonction probable d'exalter la traduction d'ARNm viral en protéines virales, structurales et de régulation ; elle augmenterait donc à la fois le taux d'ARNm et celui des protéines. La protéine Tat agit sur la longue répétition terminale (LTR) positionnée du côté 5', et plus précisément sur la séquence TAR (située entre les nucléotides + 1 et + 80), cible de la trans-activation par Tat ; en retour, TAR *cis*-active le génome viral [3].

De nombreuses études ont montré que la *trans*-activation de la réplication virale passait par une fixation directe de Tat sur la séquence TAR, induisant ainsi la transcription et les événements post-transcriptionnels, comme la traduction. Tat et TAR sont de ce

fait essentiels à la réplication [4, 5]. Les auteurs ont réalisé une série de tests sur le RO-5-3335 :

- sur une construction dans laquelle est introduit un gène *SeAP* (*secreted alkaline phosphatase*) sous contrôle du LTR du HIV et en présence de Tat ; ce gène exprime une enzyme, la phosphatase alcaline responsable de la conversion du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol. La mesure de cette activité enzymatique en présence des inhibiteurs potentiels de Tat est une bonne indication de leur efficacité ;
- sur le virus RSV dont le LTR est insensible à Tat ;
- sur des cellules COS dans lesquelles a été introduit un gène CAT exprimant la chloramphénicol acétyltransférase, et contrôlé par les séquences régulatrices (LTR) du HIV modifiées au niveau de TAR, ou de TATA ;
- sur la transcriptase inverse...

Ces tests ont montré clairement que ce composé :

- inhibe la réplication du HIV après la formation de l'ADN proviral ;
- n'a aucune action sur la transcriptase inverse, contrairement à une autre classe de benzodiazépines, les TIBO, qui sont d'ailleurs inactifs sur Tat ;
- agit, et cela est essentiel, lorsque Tat et TAR sont présents.

Les auteurs ne précisent pas si l'action RO-5-3335 se situe — ce qui est fort probable — au niveau du complexe Tat-TAR ou à celui de Tat ou de TAR pris séparément, empêchant ainsi leur association, ce qui se traduirait dans les deux cas par un effet identique.

Le mécanisme d'action de ce composé, à l'échelle moléculaire, n'est malheureusement pas clairement défini, ce qui limite d'autant la possibilité pour le chimiste de concevoir de nouvelles molécules anti-Tat, un peu à l'image de ce qui a été réalisé, par exemple,

S E T T E N O M

avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse à travers les nucléosides modifiés (AZT, DDI, DDC, D4T, carbovir...) ou avec ceux de la protéase du HIV dont le mécanisme correctement cerné a permis la mise au point, dans un laps de temps très court, d'une trentaine d'inhibiteurs dont l'un est en essai clinique. Cette molécule représente malgré tout, et les auteurs le soulignent fort justement, une tête de file dans la recherche des antagonistes de Tat.

Le RO-5-3335 présente *in vitro* une remarquable activité sur différentes lignées cellulaires chroniquement infectées, y compris sur les lymphocytes et monocytes périphériques, avec un IC_{50} (concentration de demi-inhibition) compris entre 0,1 et $1\mu M$ et un IC_{90} se situant entre 1 et $3\mu M$.

Les souches 3B, LAI, BAL/85, NIT et RF du HIV1 et ROD et UC-I du HIV2 sont sensibles à ce produit qui montre ainsi un large spectre d'activité.

De plus, cette molécule présente une bonne efficacité sur des isolats, sensibles ou résistants à l'AZT, de patients traités par l'AZT; elle manifeste également une synergie d'action avec ce dernier sans résistance croisée.

Le RO-5-3335 a, pour les récepteurs benzodiazépines du cortex cérébral du rat, une affinité inférieure à celle du diazepam. Une autre propriété intéressante, qui s'ajoute à une toxicité faible, est une grande biodisponibilité chez le chien, avec un temps de demi-vie de deux heures. Au total, il s'agit d'un résultat *in vitro* important, qui confirme l'intérêt prévisible de cette nouvelle cible moléculaire thérapeutique qu'est la protéine Tat. Il est d'autant plus important que cette dernière, outre son rôle principal dans la réplication du HIV, intervient dans la pathogénie du HIV à travers, par exemple, la stimulation des cellules de croissance du Kaposi, la réduction du taux d'anticorps dépendant de la prolifération des cellules T, la cytotoxicité des cellules T tueuses...

Il n'est pas impossible de concevoir que des antagonistes de Tat soient des agents potentiels de suppression de ces effets pathogènes.

Notons, pour conclure, que les inhibiteurs de la fonction Tat imaginés jusqu'alors reposaient sur « la neutralisation de la séquence TAR » par l'utilisation d'oligonucléotides antisens. Concept intéressant mais qui se heurte, pour l'instant, à des difficultés majeures de synthèse chimique, de sensibilité aux nucléases cellulaires, de pénétration, de vectorisation... Il s'agit donc là d'une perspective lointaine. En revanche, la découverte de cette molécule anti-Tat, dont la simplicité est l'une des principales qualités, ouvre une voie prometteuse dans la recherche de nouvelles molécules dérivant de cette dernière; elle met l'accent, de plus, sur l'émergence d'une nouvelle classe chimique anti-HIV, les benzodiazépines, dont on connaît par ailleurs le rôle en tant qu'inhibiteurs de la transcriptase inverse du HIV [6, 7]. Elle renforce, par ailleurs, l'idée qu'à l'heure actuelle la question fondamentale n'est plus du tout de se demander si une thérapie anti-rétrovirale est réalisable, mais bien plutôt comment il est possible d'utiliser les progrès réalisés dans la connaissance des interactions cellule-virus pour créer de nouvelles opportunités dans la thérapie anti-SIDA.

R. G.

1. Lévy JP. Traitement du SIDA : nouveaux médicaments, thérapies géniques. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 830-41.
2. Hsu MC, Schutt AD, Holly M, et al. Inhibition of HIV replication in acute and chronic infections *in vitro* by a Tat antagonist. *Science* 1991 ; 254 : 1799-1802.
3. Dingwall C, Emberg I, Gait MJ, et al. HIV-1 Tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* 1990 ; 9 : 4145-53.
4. Feinberg MB, Baltimore D, Frankel AD. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 4045-9.
5. Rosen CA, Pavlakis GN, Tat and Rev : positif regulators of HIV gene expression. *AIDS* 1990 ; 4 : 499-509.
6. Pauwels R, Andries K, Desmyter J, et al. Potent and selective inhibitor of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* 1990 ; 343 : 470-4.
7. Merluzzi VF, Hargrave KD, Labadia M, et al. Inhibition of HIV-1 replication by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* 1990 ; 250 : 1411-3.

■■■ BRÈVE ■■■

■■■ Régulation de l'expression du gène *MDR* par les oncogènes et les anti-oncogènes. Le gène *MDR* (*multi-drug resistance*) code pour une protéine membranaire qui semble être une pompe susceptible d'expulser de la cellule certaines substances, notamment des produits cytolytiques utilisés dans des buts de chimiothérapie. Dans certains cas, l'hyper-expression de ce gène par certaines cellules cancéreuses précède tout traitement chimiothérapique et ne peut donc être considérée comme un phénomène secondaire [1]. Une équipe composée de chercheurs américains de Bethesda (MD) et japonais de Kyoto [2] a donc testé l'hypothèse selon laquelle des oncogènes et anti-oncogènes connus pour être impliqués dans la progression tumorale pouvaient être les responsables de la modulation de l'expression de gène *MDR*. Pour ce faire, ils ont transfecté des cellules avec un gène test contrôlé par des séquences de régulation du gène *MDR* et avec des vecteurs d'expression assurant la synthèse de l'oncogène $p21^{ras}$, $p53$ normale et $p53$ mutée. Rappelons que $p53$ se comporte comme un anti-oncogène qui peut acquérir des propriétés oncogéniques par mutation (*m/s n° 8, vol. 5, p. 598 et n° 8 vol. 6, p. 821*). La protéine $p53$ normale se révéla ainsi être un inhibiteur de l'activité du promoteur du gène *MDR* alors que l'oncogène *ras* et la protéine $p53$ mutée, oncogéniques, se comportaient comme des activateurs. La fonction physiologique du gène *MDR*, qui n'est probablement pas d'expulser de la cellule des médicaments anti-cancéreux, n'est pas connue, si bien que la signification de ces résultats, en termes de coopération de différents phénomènes dans la progression tumorale, est difficile à établir. Cependant, le contrôle de l'activité *MDR* par des oncogènes et des anti-oncogènes peut expliquer la résistance d'emblée de certains cancers aux médicaments anti-mitotiques.

[1. Marie JP. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 443-9.]
 [2. Chin KV. *Science* 1992 ; 255 : 459-62.]