

VIH & CYCLE DE RÉPLICATION VIRAL

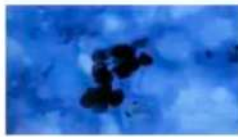


I- Introduction

1) Histoire et découverte du VIH

1981 : Apparition de pathologie opportunistes (touchent des groupes exposés, en particulier les personnes immunodéprimées avec par exemple la *pneumopathie à pneumocystose Carinii* qui provoque un sarcome de Kaposi).

- Amas de *Pneumocystis carinii* (LBA)



-Sarcome de Kaposi :



prolifération vasculaire
angiomateuse
et fibroblastique

1983 : Découverte du **VIH-1**, d'abord connu sous le nom de Lymphadenopathy Associated Virus (LAV) par **Françoise BARRÉ-SINOUSI** et ses collègues cliniciens sous l'équipe de Luc MONTAGNIER de l'Institut Pasteur.

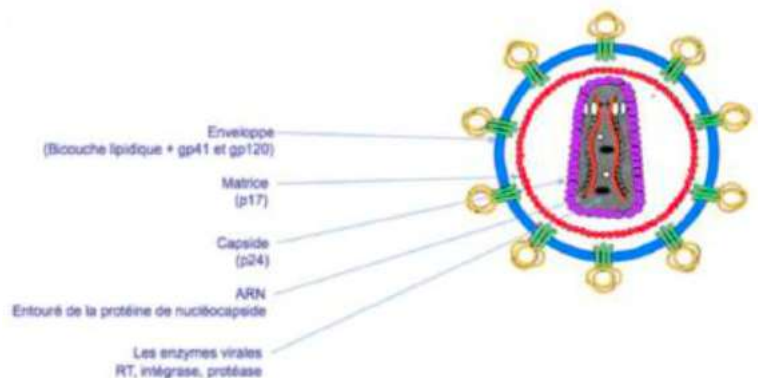
1986 : Découverte du **VIH-2**, par **François CLAVEL** sous la direction de Françoise BRUN-VEZINET de l'Institut Pasteur.

⚠ À la différence du VIH-1, le VIH-2 à une diffusion épidémiologique plus limitée (Afrique de l'ouest) avec des différences dans la structure du virus.

2) Caractéristique de ce VIH

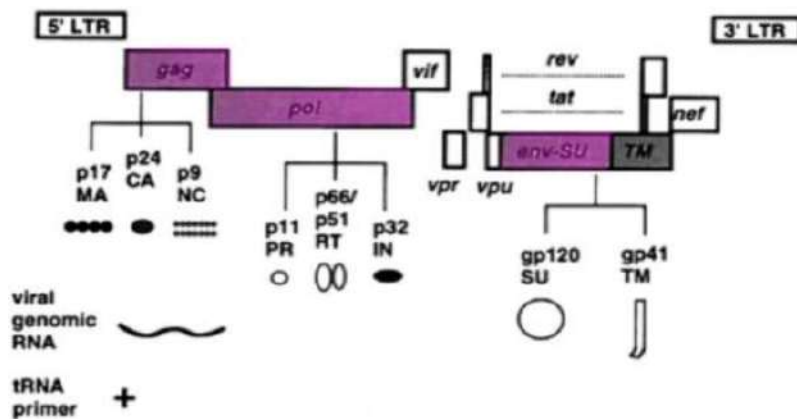
Ce virus possède une particularité car il fait partie de la famille des **RETROVIRIDAE+++** car il présente une étape de **rétrotranscription** dans son cycle C'est une particule qui est sphérique de 110 nm de diamètre avec de l'extérieur vers l'intérieur :

- **Enveloppe** : **Bicouche lipidique** qui provient de la membrane cytoplasmique hérissée de spicules glycoprotéiques d'origine virale : **GP120** et **GP41**.
- **Matrice** : Tapisse face interne de l'enveloppe, composée uniquement de **p17**.
- **Capside** : En forme de **cône tronqué** faite de **p24**.



- **ARN viral** : Constitue le génome viral, il est constitué d'un **simple brin à polarité positive ++** (*mnémo : quand on est atteint de VIH on est séropositif (+) à ne pas confondre avec la grippe*) en **deux exemplaires** identiques entouré de la protéine **nucléocapside p9**.
- **Protéines à activité enzymatique** : **la reverse transcriptase ou transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase**.
Ces 3 enzymes sont des cibles potentielles pour la **chimiothérapie antirétrovirale**. +++

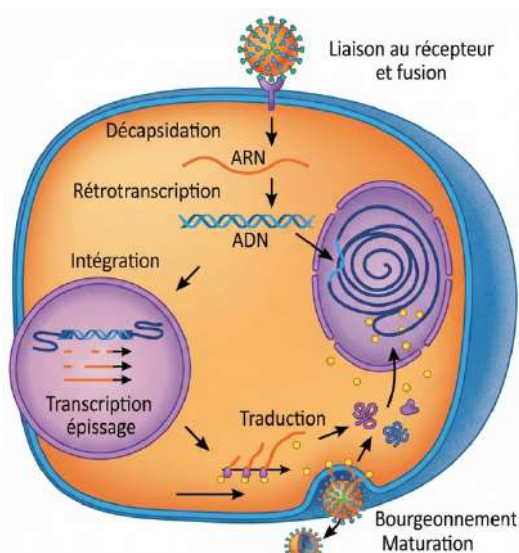
Pour synthétiser ces différentes protéines lors du **cycle de réplication**, une étape **préliminaire de synthèse des précurseurs polypeptidiques (ou polyprotéines) Gag, Gag-Pol et Env est indispensable**. Le **clivage protéolytique** de ces derniers est ensuite **nécessaire** à l'accomplissement du **cycle viral** et à la **synthèse des différentes protéines virales matures** (de structure et à activité enzymatique) : gp41, gp120, p24, p17 p9, RT, IN, PR ...
En plus de ces polyprotéines, des **protéines de régulations (tat, rev, vif, nef...)** contrôlant la synthèse des nouveaux virions, sont synthétisées.



Le clivage protéolytique des précurseurs Gag, Gag pol et env est indispensable+++ à l'accomplissement du cycle viral. Il permet d'obtenir toutes les protéines de la structure du virus comme gp120, gp41, p24, p17, p9 ; ainsi que les enzymes impliquées dans son cycle réplcatif comme RT, IN, PR ... (on en reparle plus tard)

On voit là par ex qu'à partir de gag on va avoir les protéines p17, p24 et p9, de pol les enzymes (PR, RT, IN) et d'env gp120 et gp41

II- Cycle du VIH par étape



Phase précoce du cycle réplcatif

Phase tardive du cycle réplcatif

Étape 1 : Entrée du virus dans la cellule cibles (*lymphocytes T CD4+*, *macrophages*, *cellules dendritiques*).

Cette étape se fait en **2 temps ++**

-> **Liaison** (ou attachement) aux récepteurs et corécepteurs cellulaire (sous l'indépendance forte de **gp120** virale et des protéines cellulaires).

-> **Fusion** entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique.

Un virus ne sait pas vivre sans cellule, il a besoin de rentrer dans cette dernière pour se répliquer ++

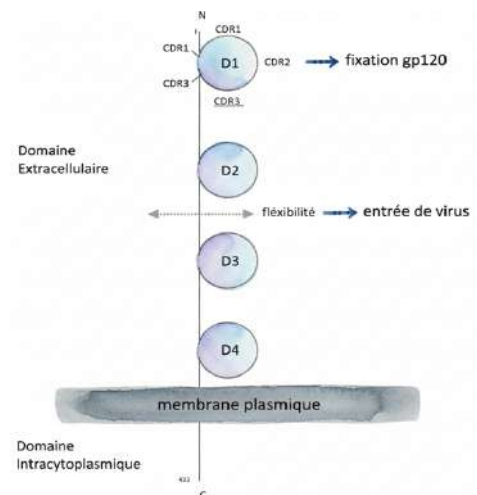
Les protéines cellulaires impliquées dans la liaison :

▪ Récepteur CD4

Glycoprotéines transmembranaire retrouvée chez une sous population de lymphocytes T composée d'un petit domaine **intracytoplasmique** et d'un domaine **extracellulaire** énorme comprenant **2 régions** :

- **Région CDR2 du domaine D1** : où se fixe **gp120**

- **Région flexibilité** : subit modification conformationnelle à la suite de la fixation de **gp120**



▪ Corécepteurs

Récepteurs des chimiokines = cytokines chimiotactiques

- 7 domaines transmembranaires

- Couplés aux protéines G

2 types :

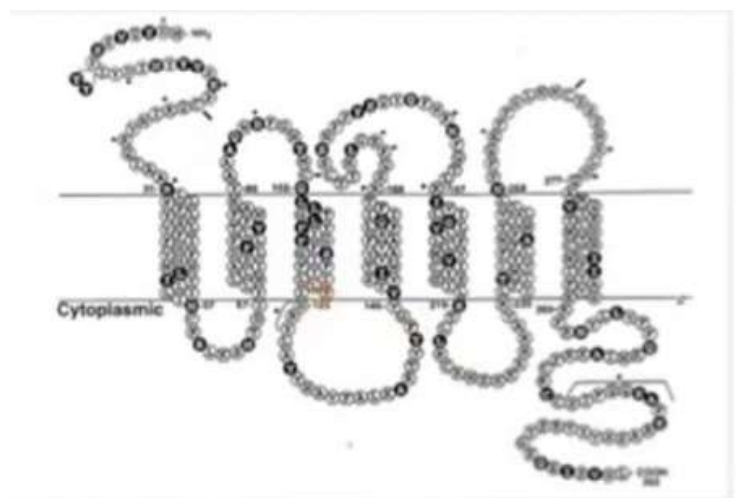
CXCR 4 (**alpha**-chimiokines)

Ligand naturel : SDF-1

CCR5 (**bé**ta-chimiokines)

Ligands naturels : RANTES ; MIP-1a ;

MIP-1b



ATTENTION +++++ : SI LA CELLULE NE PRESENTE PAS, AU MOINS LE CD4, ET UNE DE CES DEUX PROTEINES CELLULAIRES, LE VIRUS EST INCAPABLE DE L'INFECTER !!

Les protéines virales impliquées dans la liaison :

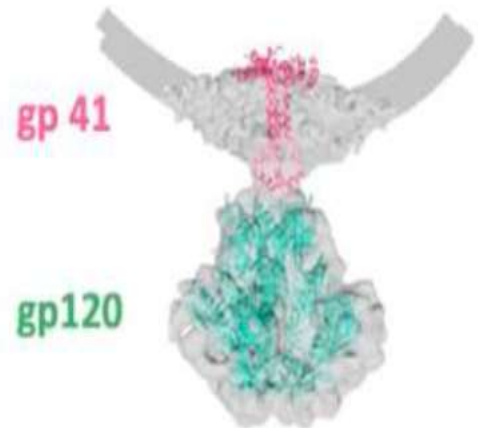
▪ GP120

Glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1, il s'agit d'une protéine **globulaire contenant des régions très variables**, flexible et fortement **glycosylée** (50%). Elle permet l'étape d'attachement et subit **2 changements conformationnels** successifs :

- Après la fixation à CD4
- Après la fixation au corécepteur

▪ GP41

Glycoprotéine transmembranaire **repliée DANS la gp120** (qui la masque au système immunitaire). Permet la fusion à la suite des modifications conformationnelles induites par la 1^{ère} étape d'attachement.



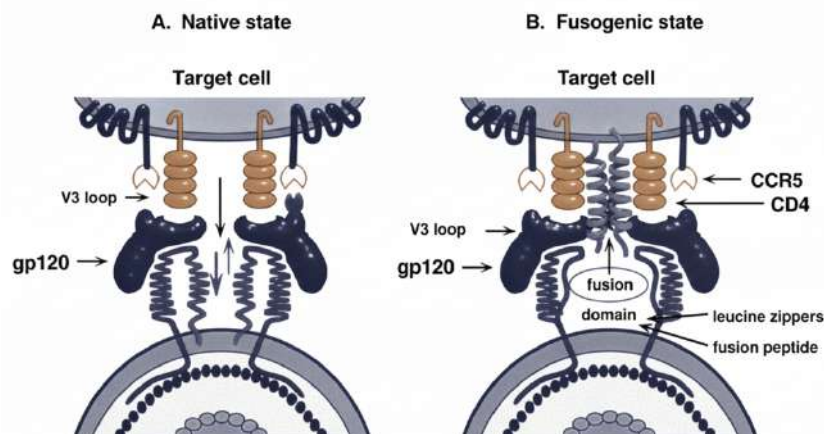
1. LIAISON

1^{ère} interaction entre Gp120 et la protéine CD4 :

Mise en évidence par inhibition de l'entrée du virus en présence d'anticorps anti-CD4

Gp120 se fixe au niveau du domaine extracellulaire de la protéine CD4 (le domaine Ig like D1= CDR2 sur le schéma du récepteur CD4 plus haut).

Cela entraîne une **MODIFICATION CONFORMATIONNELLE +++++** de CD4, au niveau de sa région flexible (elle se plie). **Gp120** change également de conformation (=1^{er} changement conformationnel, **INDISPENSABLES POUR ASSURER LA LIAISON AUX CORÉCEPTEURS +++**)

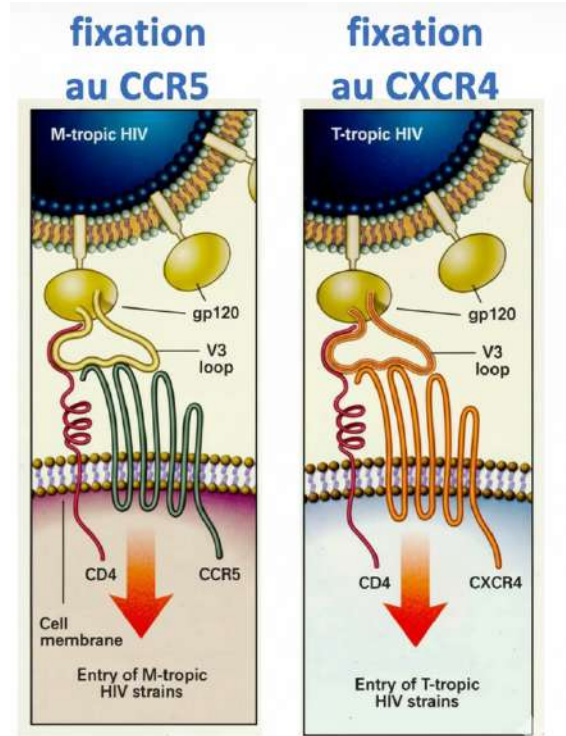


2^{ème} interaction entre gp120 et les corécepteurs :
Mise en évidence par inhibition de l'entrée du virus en présence de Bêta-chimiokines

Gp 120 se fixe sur la partie N-terminale d'un des corécepteurs (après s'être fixée à CD4 et avoir changé de conformation) : soit sur CCR5, soit sur CXCR4

Des MODIFICATION CONFORMATIONNELLES des 2 protéines permettent l'étape de fusion.
+++

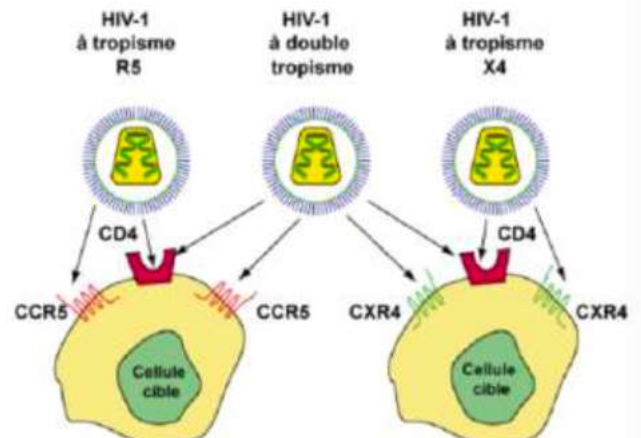
Certains patients « long term non progressor » possèdent naturellement un taux de bêta-chimiokines circulant très élevé empêchant la fixation du virus sur le corécepteur CCR5, pourquoi ?



On va voir maintenant conséquences physiopathologiques et à la notion de tropisme :

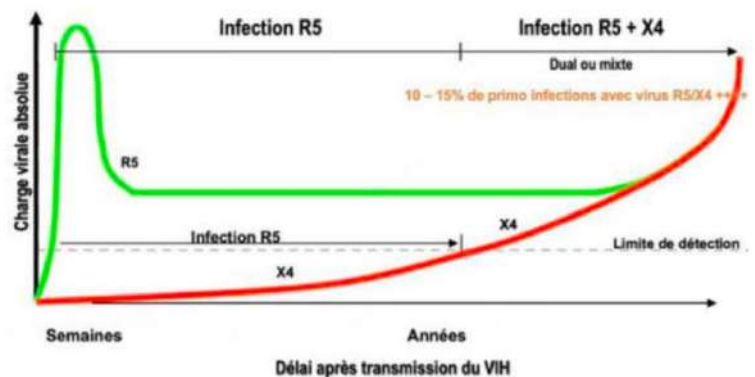
Les souches du virus vont cibler différents types cellulaires, on parle de tropisme cellulaire, défini par la voie d'entrée du virus :

- ° Souches **tropisme R5** : macrophages, monocytes, cellules dendritiques
 - Entrée via **CD4** et **CCR5**
- ° Souches à **tropisme X4** : lymphocyte T
 - Entrée via **CD4** et **CXCR4**
- ° Souches à **double tropisme** :
 - Entré par **CD4** et **CCR5** ou **CXCR4**



En général, les patients sont infectés par des souches à tropisme **R5** au **début** de l'infection et au cours de l'évolution de la maladie, les virus à tropisme **X4** vont apparaître et devenir majoritaires.

⚠ Importance thérapeutique :
Anti-CCR5 (Maraviroc) : Inhibe l'entrée du VIH en se fixant sur CCR5 (nécessite que le patient soit infecté par des souches tropisme R5).

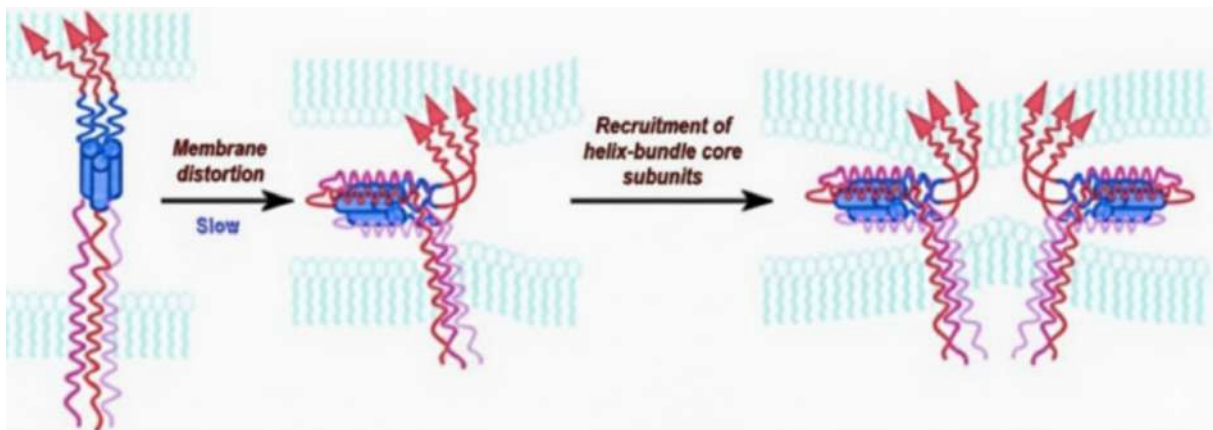


2. FUSION

Après interaction de **GP120** et du corécepteur, on voit apparaître **GP41** qui était jusque-là cachée à l'intérieur de celle-ci (donc **grâce** à la **modification conformationnelle** de **GP120**)+++.

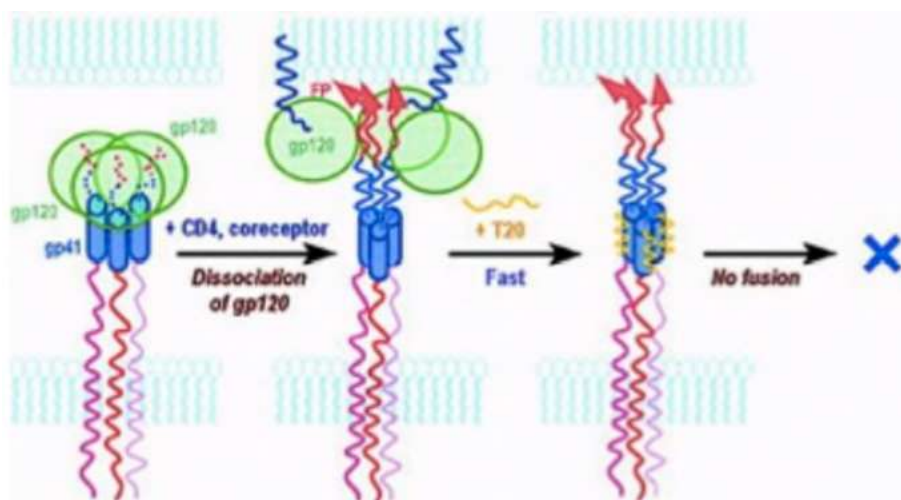
Déclenchée par la région fusiogène de gp41 (notamment la région de la N-terminale de gp41) qui permet :

- **Ancrage** de la région fusiogène gp41 dans la membrane plasmique de la cellule cible.
- **Rapprochement** entre enveloppe du virus et membrane cytoplasmique (par repliement de la gp41 sur elle-même = modification appelée « zipping »)
- **Contact** entre enveloppe virale et la membrane plasmique
- **Formation** d'un pore par phénomène de fusion-lyse (permet l'entrée de la capside dans la cellule)



Thérapeutique :

- **Anti GP41** : Se lie à la molécule et inhibe son changement de conformation (ex : *Polypeptide T20* qui bloque le repliement de gp4).



Cellules infectables

Différentes catégories de cellules peuvent être infectées par le virus mais **TOUTES** expriment le CD4 à leur surface. ++++ (pas de CD4, pas d'infection possible)

Dans le **sang circulant**, sont infectés :

- Les **lymphocytes T CD4 +**, en particulier les cellules T CD4+ mémoires.
- Les **monocytes circulants**, exprimant la molécule CD4 à un niveau moindre que les lymphocytes T CD4+

Dans les **tissus**, sont infectés :

- Les cellules du système **monocyte-macrophage**
- Les **cellules dendritiques**
- Les **lymphocytes T CD4+** présent dans les tissus

Ces cellules sont des **réservoirs de l'infection virale** (dans les ganglions, le tube digestif, ...)

Dans les follicules lymphoïdes (qui sont le principal organe/tissus cible de l'infection virale), les cellules folliculaires dendritiques, élément architectural essentiel de ces follicules, capturent les particules virales et les présentent aux cellules lymphoïdes.

SI ON BLOQUE LES CHANGEMENTS CONFORMATIONNELLS, ON BLOQUE L'ENTREE DU VIRUS DANS LA CELLULE.

Récap traitement :

Anti-gp120 (Foestemsavir)	inhibant l'attachement du virus à la cellule cible
Anti-gp41 (T20)	inhibe le changement de conformation de cette protéine virale
Inhibiteurs post attachement (Ibalizumab)	empêchent les modifications de conformation de CD4
Anti-CCR5 (Maraviroc)	inhibant l'entrée du VIH en se fixant sur le corécepteur CCR5 (nécessite tropisme CCR5)

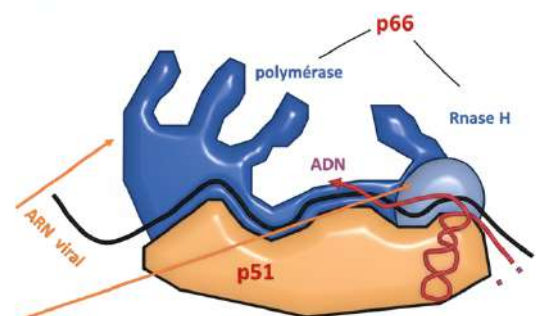
Après cette première étape de liaison et fusion :

- 1- Par **endocytose**, le **virus entre dans la cellule** et la **décapsidation** a lieu (=disparition de la capsid virale afin de rendre **l'ARN accessible**+++)
- 2- Puis la **rétrotranscription**

Étape 2 : rétrotranscription de l'ARN viral et formation du provirus

Cette étape est possible grâce à la reverse transcriptase (RT). Il s'agit d'un **hétérodimère** (p66/p51) en forme de main droite :

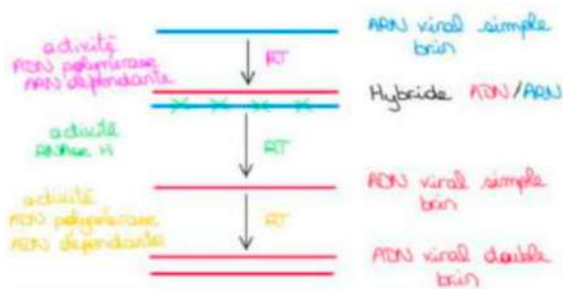
- **Reçoit l'ARN viral** entre le « **pouce** » et la **base** des « **autres doigts** ». C'est ici qu'est **synthétisé l'ADN proviral**, avec comme **matrice l'ARN génomique**.



Activités enzymatiques de la RT :

- Synthèse du premier brin d'ADN à l'aide du brin d'ARN
Activité **ADN-polymérase / ARN-dépendante**
- Hydrolyse de la matrice ARN (*qui a servi pour la synthèse du brin ADN*)
Activité **Rnase H** (*RNase H dégrade matrice ARN*)
- Duplication de l'ADN synthétisé
Activité **ADN-polymérase / ADN-dépendante**
- Également opérations de transfert d'un brin d'ADN
Assure la production de deux LTR aux extrémités du provirus (=ADN nouvellement synthétisée).

Récap activité ++ :



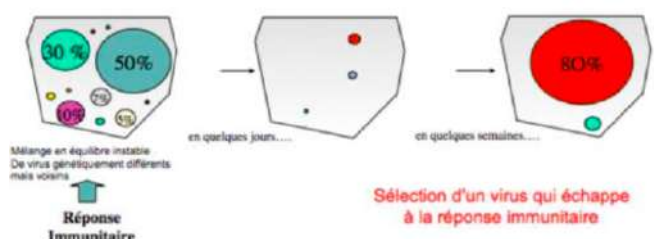
Cinétique complexe pour obtenir un provirus :

- A- On part d'un premier brin, synthétisé à partir de l'ARN viral
- B- Fin de synthèse du 1^{er} brin d'ADN
- C- Et pour finir synthèse du 2^{ème} brin d'ADN

À la fin de ces étapes, on obtient un double brin d'ADN (=provirus++) qui comporte aux extrémités des « **Long Terminal Repeats** » (LTR) qui vont avoir une importance dans l'étape d'intégration (qui est l'étape suivante).

Conséquences physiopathologiques liées à cette étape :

La reverse transcriptase est une enzyme qui n'est **pas fidèle+++**. Lors de la phase de « recopiage » il va y avoir des **erreurs lors de la phase de « recopiage »** qui ne seront pas corrigées (car la RT ne possède pas de mécanisme de correction) \approx 1 mutations toutes les 1000 ou 10 000 bases synthétisées. De plus, s'attacher et se détacher de l'ADN et de l'ARN viral lors des opérations de transfert de brin entraîne aussi un **risque d'erreur par dérapage** (frameshift) à chaque ré-attachement. Il en résulte que la population virale chez un patient infecté est un **mélange en équilibre instable de virus génétiquement différents mais voisins**. Comme beaucoup de nouveaux virus sont produits chaque jour cela provoque une grande diversité : on parle de **QUASI-ESPECE +++**, d'où vont **émerger les variants antigéniques et les mutants résistants aux antiviraux** (la population virale peut échapper aux thérapeutiques antirétrovirales).



⚠ C'est cette situation que l'on souhaite contrer avec la mise en place d'une thérapeutique qui permet d'éviter la création de nouveaux variants résistants qui pourrait échapper à la réponse du système immunitaire.

Thérapeutique :

Pour cette enzyme, il existe 2 types d'inhibiteurs :

- Les inhibiteurs **nucléosidiques** ou nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)
- Les inhibiteurs **non-nucléosidiques** de la transcriptase inverse (INNTI)

Mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI).

La Zidovudine est le **premier inhibiteur de la transcriptase inverse (RT)**.

- C'est un **analogue de la thymidine**.
- Il agit comme **terminateur de chaîne** car il ne possède pas de radical 3'OH pour l'accrochage de nouveaux nucléotides, mais un groupement **N3**.
- Il s'agit d'une **prodrogue car non phosphorylée** initialement.
- **In vivo**, il est transformé en sa forme active, l'**AZT-triphosphate (AZT-TP)**, par l'action de kinases cellulaires.

Le mécanisme d'action :

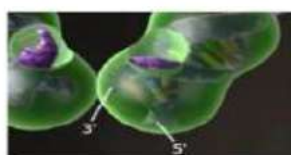
- L'**AZT-TP** est incorporé dans la chaîne d'ADN viral en cours de synthèse par **compétition** avec les nucléosides naturels.
- Cette incorporation provoque un **arrêt de l'élongation de la chaîne d'ADN** viral naissant.

L'**AZT** n'est **pas efficace en monothérapie à long terme** en raison de deux mécanismes de résistance :

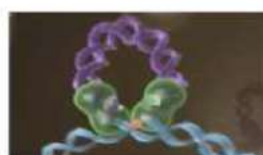
1. **Diminution de l'affinité de l'analogue :**
 - **Mutation de la RT** qui n'incorpore plus l'**AZT** lors de la synthèse du brin d'ADN.
2. **Excision de l'analogue après incorporation :**
 - **Mutations de la RT** induisant une nouvelle activité : la RT acquiert la capacité de **retirer l'AZT** de l'ADN néosynthétisé par hydrolyse et de le **remplacer par une Thymidine naturelle**.

Étape 3 : Intégration du provirus VIH

Après passage du pore nucléaire le **provirus (ADN double brin viral néosynthétisé)** va **pouvoir s'intégrer au génome cellulaire**. Cette étape est sous la dépendance d'une enzyme virale : **l'intégrase VIH**.



L'intégrase virale clive les extrémités du provirus VIH



L'intégrase virale clive l'ADN cellulaire et met en contact les extrémités d'ADN VIH et cellulaire

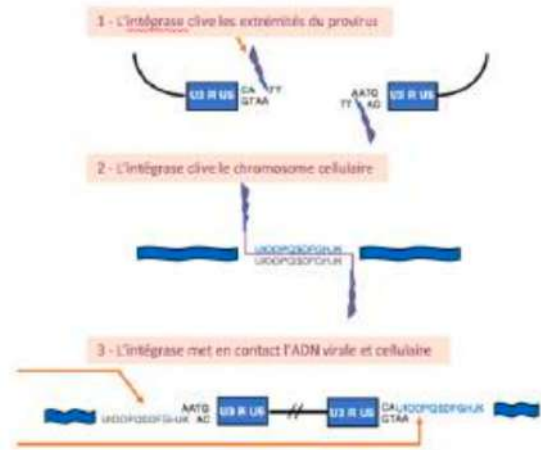


Les enzymes cellulaires réparent l'ADN

Cette dernière va :

- 1- Cliver les extrémités du **provirus** (les extrémités des LTR)
- 2- Se fixer sur le **provirus** et migrer avec lui à travers le pore nucléaire
- 3- Cliver aléatoirement l'**ADN cellulaire**
- 4- Maintenir le **provirus** au contact de l'**ADN cellulaire**

Par la suite, l'ADN va être réparée par les enzymes cellulaire, à partir de là, le provirus est **INTÉGRÉ** dans le génome cellulaire et pourra être maturé comme tous les autres gènes de la cellule.



Thérapeutique :

Anti-intégrases : molécules qui se lient au site catalytique de l'enzyme

- **Empêchent le clivage** de l'ADN cellulaire.
- **Le génome viral ne peut pas être intégré** dans le génome cellulaire et il sera progressivement hydrolysé et détruit (pas de suite au cycle viral).

Étape 4 : Transcription et traduction des gènes viraux

L'**ADN viral** étant intégré à l'ADN de la cellule, le virus va **profiter de toute la machinerie cellulaire**. **Il n'y a donc pas de thérapeutiques pour cette étape+++**

Transcription

L'ADN viral étant intégré dans l'ADN cellulaire cette étape de transcription va être réalisée grâce aux ARN polymérases cellulaires : **le virus "profite" de toute la machinerie cellulaire +++**.

Les ARNm viraux ont un seul site de déclenchement (LTR5') et de fin de la transcription (LTR3') mais l'épissage (découpages et réassemblages) permet d'obtenir de **nombreux ARNm** codant pour différentes protéines virales.

Traduction et transport des protéines de structure

Il existe **2 voies distinctes** de **synthèse des précurseurs polypeptidiques**

Polyprotéine env :

Traduite et routée **comme les autres protéines cellulaires** dans les **différents compartiments cellulaires (RE et Golgi)**. Elle y subit les **modifications post traductionnelles** comme les autres protéines cellulaires (**glycosylation et clivage par une protéase cellulaire** pour obtenir gp120 et gp41).

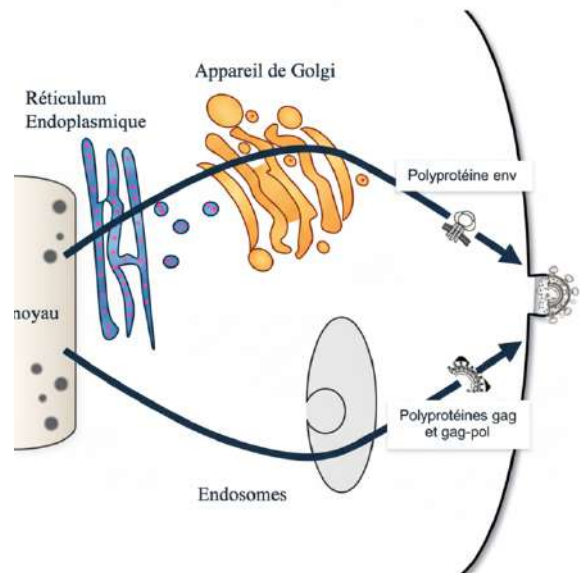
Les protéines matures gp120 et gp41 se localisent dans le bourgeon en cours de formation.

Polyprotéines gag et gag-pol :

Traduites dans le cytoplasme. Elles sont routées par des protéines cellulaires cytoplasmiques (= **protéines endosomales d'adressage**) sans passer dans les différents compartiments cellulaires (RE et Golgi).

Les polyprotéines **immatures** (toutes les protéines autres que les protéines d'enveloppe), couplées au génome viral, **se localisent dans le bourgeon en cours de formation.**

La maturation de ces polyprotéines par la **protéase virale** aura lieu après l'étape de **bourgeoisement**



Ainsi, nous avons créé un **nouveau virion immature.**

Étape 5 : Maturation du virion et clivage des précurseurs polypeptidiques gag et gag-pol assemblage

Clivage des précurseurs gag et gag-pol

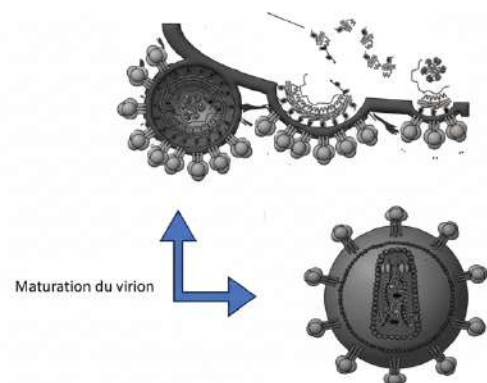
La **protéase virale**, active sous forme **dimérique**, est absolument essentielle pour la maturation du virion. Elle clive les polyprotéines gag et gag-pol.

Le clivage des précurseurs est **nécessaire à l'accomplissement du cycle viral** et à la **synthèse des différentes protéines virales matures** (de structure et à activité enzymatique) : gp41, gp120, p24, p17, p9 RT, IN, PR.

Cette maturation protéolytique aboutit après l'étape de bourgeoisement. Si cette étape de clivage n'est pas effectuée, les nouveaux virions formés ne seront jamais infectieux.

Assemblage des protéines de structure

- Les **protéines p24** forment la capsid virale (s'auto-assemblent d'abord en capsomère)
- Les **protéines p17** forment la matrice virale
- Les **protéines p9** forment la nucléocapsid virale



Thérapeutiques :

Anti-protéases se lient au site actif (catalytique) de l'enzyme virale et **empêchent le clivage des précurseurs polypeptidiques** (il n'y aura jamais de capsid dans le virion par exemple).

Les inhibiteurs de maturation bloquent la formation de la capsid, bien que l'étape de clivage ait bien eu lieu (pas d'assemblage en capsomère) en inhibant l'hexamérisation.

Pour finir :



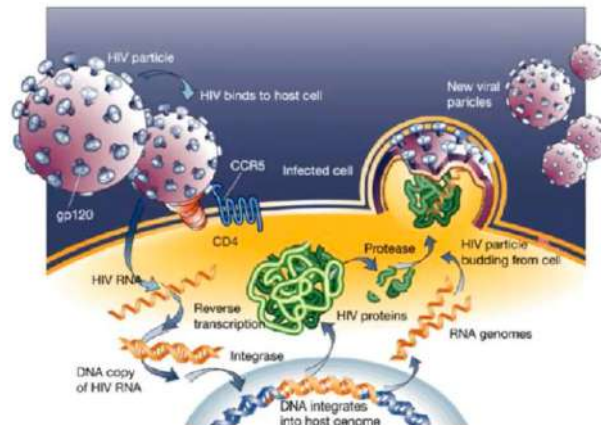
On ne distingue pas les polyprotéines à l'intérieur des bourgeons en formation mais l'enveloppe est bien visible ainsi que la capside des virions matures

Les virus matures sont INFECTIEUX.

Microscopie électronique on distingue bien la capside et l'enveloppe d'un virus ici mature.

RESUME DU CYCLE REPLICATIF DU VIH

- Production d'une grande quantité de virion
- Mais l'étape de rétrotranscription a introduit des mutations
- Les virus produits sont différents du virus qui a infecté la cellule



RESUME DES THERAPEUTIQUES ANTI RETROVIRALES

8 classes d'antirétroviraux se répartissent sur les 4 cibles que sont l'**enveloppe**, la **transcriptase inverse**, l'**intégrase (pour le provirus)** et la **protéase (pour la maturation du virions)** :

✕ Les inhibiteurs d'entrée sont de 4 sortes :

- ♣ Inhibiteurs d'attachement (anti-GP120)
- ♣ Inhibiteurs post attachement (stoppent les modifications de conformation de CD4)
- ♣ Antagonistes du corécepteur CCR5.
ATTENTION : il faut vérifier que la souche virale entre via le CCR5
- ♣ Inhibiteurs de la fusion, ciblés sur la gp41, comme le T-20 (se fixant sur la gp41, empêchant le repliement)

✕ Les inhibiteurs de la transcriptase inverse et intégrase :

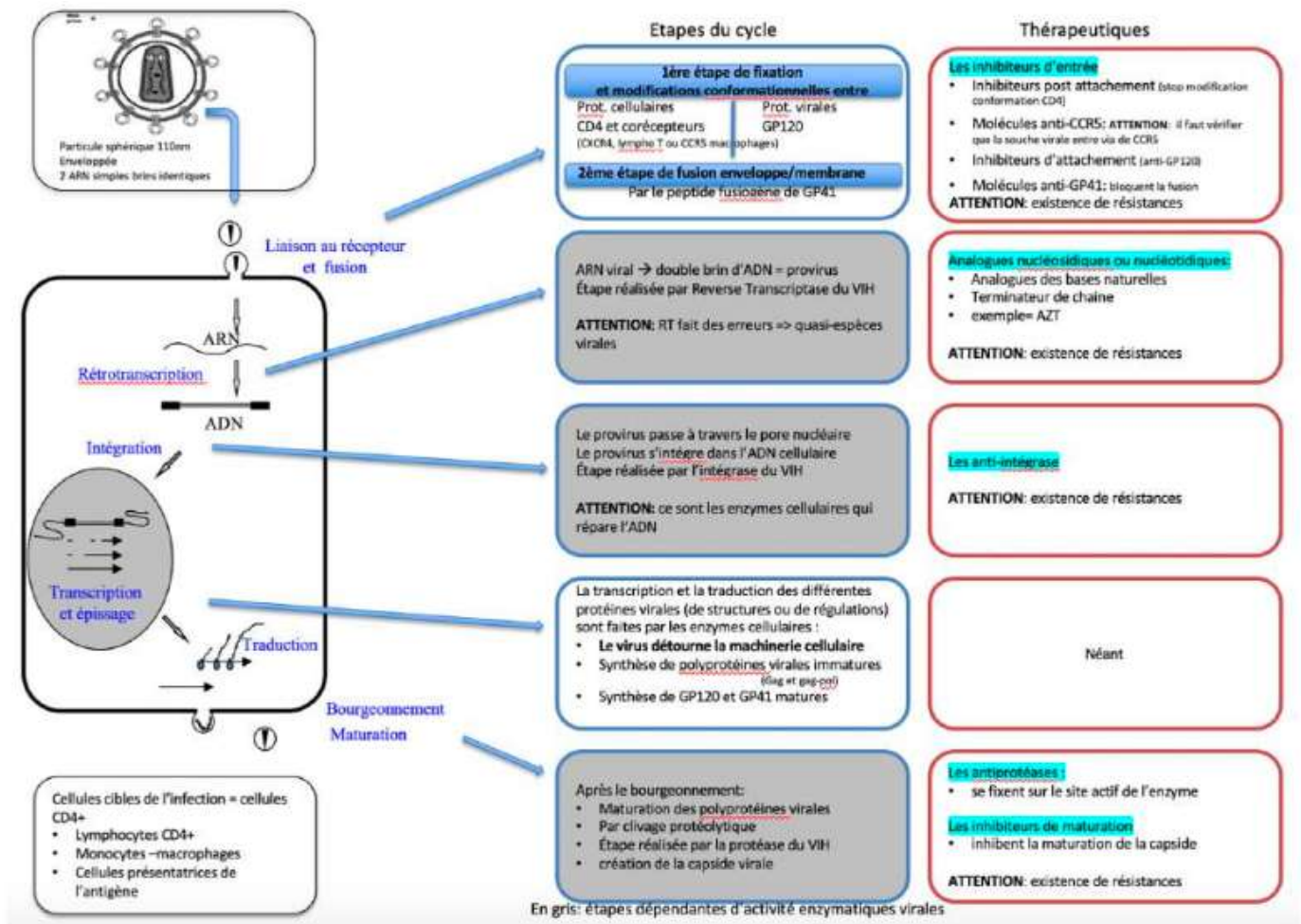
- ♣ Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)
- ♣ Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)
- ♣ Les inhibiteurs d'intégrase (IN)

✕ Les inhibiteurs de la protéase (antiprotéases)

RESUME DES CIBLES ANTI RETROVIRALES

Entrée du virus dans la cellule cible	<ul style="list-style-type: none"> o Inhibiteurs d'attachement (anti-GP120) o Inhibiteurs post attachement (stoppent CD4) o Antagonistes du corécepteur CCR5. o Inhibiteurs de la fusion stoppent gp41
Rétrotranscription de l'ARN viral et formation du provirus	<ul style="list-style-type: none"> o Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) o Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)
Intégration du provirus VIH	o Inhibiteurs de l'intégrase
Traduction et transcription des gènes viraux	✗
Clivage des précurseurs polypeptidiques gag et gag-pol et assemblage du virion	o Les inhibiteurs de la protéase (antiprotéases)

/ RÉCAP DE LA PROF /



Courage et force pour ce cours ainsi que pour le S2...