

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 novembre 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/103654 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 21/64

POLARD, Valérie [FR/FR]; 5, rue Louise, F-94140
Alfortville (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000874

(74) Mandataire : **BREESE DERAMBURE MAJEROW-
ICZ**; 38, avenue de l'Opéra, F-75002 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 11 avril 2005 (11.04.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0403782 9 avril 2004 (09.04.2004) FR
0403783 9 avril 2004 (09.04.2004) FR

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOALLIANCE PHARMA [FR/FR]; 59, avenue du
Général Martial Valin, F-75015 Paris (FR). **ECOLE
NORMALE SUPERIEURE CACHAN-ENS CACHAN**
[FR/FR]; 61, avenue du Président Wilson, F-94235
Cachan Cedex (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS** [FR/FR]; 3, rue
Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 6 (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **AUCLAIR,
Christian** [FR/FR]; 22, avenue Parmentier, F-75011 Paris
(FR). **SUBRA, Frédéric** [FR/FR]; 3 bis, rue d'Athènes,
F-75009 Paris (FR). **MOUSCADET, Jean-François**
[FR/FR]; 62, rue de Bagneux, F-92330 Sceaux (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFICATION OF COMPOUNDS ACTIVE IN HIV VIRUS REPLICATION

(54) Titre : METHODE D'IDENTIFICATION DE COMPOSES ACTIFS SUR LA REPLICATION DU VIRUS HIV.

(57) Abstract: The invention relates to a method or identification of compounds able to affect the replication of a virus of the HIV type, in which the polymerisation of the actin, induced by the VPR protein, or a fragment or derivative thereof in a cell or cellular extract comprising the actin in the presence of said compound is analysed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode d'identification de composés capables d'agir sur la réplication d'un virus du type VIH, dans laquelle on analyse la polymérisation de l'actine induite par la protéine VPR, un fragment ou un dérivé de celle-ci sur une cellule ou un extrait cellulaire comprenant de l'actine, en présence dudit composé.



WO 2005/103654 A2

METHODE D'IDENTIFICATION DE COMPOSÉS ACTIFS SUR LA RÉPLICATION
DU VIRUS HIV.

La présente invention concerne le domaine du criblage de
5 composés pour leur activité sur la réplication d'un virus du
type VIH.

Le VIH est un rétrovirus de la famille des lentivirus. Le
génom viral du VIH est composé d'un ARN de 9Kb codant pour
les trois protéines essentielles précurseurs communes à tous
10 les rétrovirus (GAG, POL et ENV) et pour de nombreuses
protéines régulatrices, spécifiques du VIH (Figure 1).

Le VIH est le plus complexe des rétrovirus et au total le
génom viral code pour 13 protéines dont 8 essentielles et 5
de régulation.

15 L'ARN viral messenger est épissé pour donner un ARN de 4Kb
et un ARN de 2Kb. L'ARN de 4Kb servira de matrice pour
synthétiser la Gp120, la Gp41 et trois protéines de régulation
(VIF, VPR et VPU). L'ARN de 2Kb est à l'origine de trois
autres protéines régulatrices (TAT, REV et NEF).

20 Les protéines virales essentielles sont les suivantes:

- Membrane (ENV) : Gp120 et Gp41 ;
- Protéines de structure (GAG) : Matrice p17, Capside p24
et Nucléocapside Ncp7 ;
- Enzymes virales (POL) : RT p66, Intégrase INT p32 et
25 Protéase p9.

Les protéines de régulation sont les suivantes: TAT, REV,
VPU, NEF, VPR et VIF.

Les lentivirus se différencient des autres rétrovirus par
leur capacité à infecter des cellules non multipliantes
30 (monocytes, macrophages). Cette capacité infective nécessite
entre autre que le matériel viral compétent pour assurer le
processus d'intégration (complexe de préintégration) puisse
franchir la membrane nucléaire. Cette aptitude à la
translocation cytoplasme-noyau est due aux propriétés de

certaines protéines virales, notamment de VPR qui semble jouer un rôle clé dans ce processus.

VPR est une protéine basique de 14 kDa et de 96 amino
acides qui confère un avantage répliatif significatif aux
virus qui l'expriment. Cet effet, négligeable dans les
cellules en voie de multiplication active, devient important
dans les monocytes et macrophages en phase G0. Ainsi, les
virions exprimant VPR présentent un cycle répliatif 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 via son domaine
C-terminal et la protéine p6 (Lu et al., 1995). 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 ADN-ADN. Un
effet de VPR au niveau de l'étape de préintégration a été
suggéré en l'identifiant comme composant participant avec la
protéine de matrice Gag p17 et l'intégrase (IN) au transport
vers le noyau du complexe de préintégration (PIC) dans les
macrophages à l'état stationnaire (Heinzinger et al., 1994).

Comme indiqué sur la figure 2, VPR semble faire partie
intégrante du complexe de translocation composé des protéines
du PIC, dont certaines présentent un NLS classique, de l'alpha
importine et de nucléporines. Ce complexe semble être
compétent pour la translocation cytoplasme-noyau via le pore
nucléaire.

Par ailleurs, un nouveau concept permettant d'expliquer
l'entrée du PIC dans le noyau a été proposé par Segura-Totten
et Noronha (Segura-Totten et Wilson, 2001; Noronha et al,
2001). Le modèle suggère que VPR, détachée du CPI, entre dans
le noyau par les pores nucléaires et désorganise la structure
filamenteuse de la lamina présente sous l'enveloppe nucléaire.

Cet évènement induirait la décondensation de la chromatine et la rupture momentanée de l'enveloppe nucléaire permettant ainsi au PIC de pénétrer dans le noyau.

Il est remarquable de constater que 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 classique. VPR pourrait enfin agir également en transactivant modérément le LTR et augmenter ainsi le niveau de l'expression des gènes viraux. Cette transactivation serait suffisante pour promouvoir l'activité du LTR immédiatement après l'intégration et avant la synthèse de la protéine TAT (Hrimech et al., 1999; Sawaya et al., 2000; Vanitharani et al., 2001). L'interaction de VPR avec certains facteurs de transcription comme TFIIB et SP1 serait à la base de ce mécanisme (Agostini et al., 1999 et Wang et al., 1995).

VPR semble par ailleurs interférer avec les processus de multiplication cellulaire. Cette découverte découle de l'observation selon laquelle, des cellules de rhabdomyosarcome (TE671 et RD) et d'ostéosarcome (D17) infectées par le VIH entraient dans un processus de différenciation accompagné d'un blocage de la multiplication (Levy et al, 1993). Il a aussi été montré que cette protéine indépendamment de tout contexte viral bloque le cycle cellulaire en G2. Une des hypothèses émises à ce jour est que VPR, en s'associant à la Ser/Thr-protéine phosphatase PP2A, qui elle-même intervient dans la régulation de la PKC, pourrait bloquer le cycle cellulaire. À noter incidemment que PP2A est la cible de l'acide okadaïque, une toxine produit par le dinoflagellé *Prorocentrum lima*.

En fait l'action de VPR tant sur le plan de son implication dans l'infectivité du VIH que sur celui de la perturbation du cycle cellulaire reste énigmatique. Toutefois, il est important de remarquer que :

- VPR semble jouer un rôle prépondérant dans l'infection par le VIH des cellules quiescentes, ce qui est cohérent avec son action présumée de facilitation de la translocation du

complexe de préintégration du cytoplasme vers le noyau. De ce point de vue, la perturbation de cette activité fonctionnelle représente une approche thérapeutique possible.

5 - Introduit dans une cellule, en dehors de tout contexte viral, VPR induit clairement le blocage du cycle cellulaire. Sur le plan théorique, cela peut être mis à profit dans un objectif d'action antiproliférative en cancérologie.

10 Il a maintenant été observé que des cellules infectées par le VIH montrent d'une manière constante des modifications structurales du réseau d'actine, notamment au niveau périnucléaire. Ces modifications sont caractérisées par la formation d'invaginations d'actine au niveau de la membrane nucléaire dont l'apparence est celle de filopodes. La croissance des filopodes intervenant habituellement au niveau
15 des membranes cellulaires est le résultat d'un processus de polymérisation de l'actine G (forme monomérique) qui donne naissance à de long filament d'actine F (polymère). La polymérisation de l'actine est sous le contrôle d'un certain nombre de protéines cellulaires dont certaines sont capables
20 d'induire sa polymérisation. C'est notamment le cas de la protéine WASP qui interagit et est activée par CDC42-GTP, et peut ensuite stimuler la polymérisation des filaments d'actine en activant le complexe nucléateur ARP2/3. C'est également le cas de la zyxine qui contribue à la structuration de
25 l'ensemble du cytosquelette et intervient dans les processus de motilité.

Shafer *et al.* (*Mol. Cell. Biol.*, vol.11, p :559A, 2000) décrit la fixation de VPR à l'actine F et la stabilisation consécutive des filaments d'actine *in vitro*.

30 Matarrese *et al.* (*Cell Death and Differentiation*, vol.7, p :25-36, 2000) décrit la modification de la structure des filaments d'actine dans des cellules exprimant la protéine VPR et l'homologie entre VPR et la protéine de levure Sac-1p qui se lie potentiellement à l'actine.

35 Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis de montrer que la protéine VPR pourrait moduler la « dynamique » de polymérisation de

l'actine. Cette modulation pourrait ainsi mieux expliquer les modifications structurales observées dans les réseaux d'actine périnucléaire et éventuellement la perturbation du cycle cellulaire.

5 Les inventeurs ont ainsi montré, en présence de VPR, une très forte augmentation de la constante de vitesse de polymérisation ainsi qu'une valeur très élevée de la concentration d'actine F à l'état stationnaire. Ces augmentations sont bien supérieures à celles obtenues en
10 présence de phalloïdine à des concentrations saturantes. Ces résultats suggèrent un mécanisme d'action de VPR sur la polymérisation de l'actine différent notamment de celui de la phalloïdine qui stabilise l'actine F en se fixant à celle-ci, et implique vraisemblablement également l'inhibition de
15 l'activité de certaines protéines impliquées dans la dépolymérisation de l'actine.

Les inventeurs ont ainsi mis en évidence que l'augmentation de la polymérisation de l'actine en présence de VPR pourrait résulter de la fixation de VPR à PP2A. En effet, cette
20 phosphatase se trouve être un modulateur de la LIM kinase qui elle-même intervient dans l'inhibition de la cofiline, laquelle est impliquée dans la déstructuration de l'actine F. Ainsi, l'inhibition de la phosphatase par VPR induirait l'activation de la LIM kinase, induisant elle-même
25 l'inhibition de la cofiline. L'inhibition de PP2A par VPR serait donc responsable d'une diminution de la vitesse de dépolymérisation de l'actine et expliquerait la très forte augmentation de la constante de vitesse de polymérisation ainsi que la valeur très élevée de la concentration d'actine F
30 à l'état stationnaire au regard de la phalloïdine.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont donc permis de mettre en évidence que VPR exerce *in vitro* une forte augmentation de la cinétique de polymérisation de l'actine cellulaire présente dans des
35 extraits de fibroblastes. Cet effet est considéré comme une activité fonctionnelle de VPR potentiellement impliquée dans le processus de translocation cytoplasme-noyau du complexe de

préintégration du VIH-1 dans les cellules quiescentes infectées par le virus.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention ont également permis de caractériser le processus
5 d'activation de la polymérisation de l'actine par VPR en identifiant les domaines peptidiques de VPR responsables de cet effet.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention ont tout particulièrement mis en évidence que le
10 sous-domaine 55-75 de l'hélice alpha 3 de la protéine VPR, vectorisé dans des cellules malignes induit une réapparition des filaments d'actine et une restauration des interactions intercellulaires, ce qui correspond à une réversion du phénotype tumoral.

15 La séquence du fragment 55-75 est donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.6.

En conséquence, les agents inhibiteurs du mécanisme spécifique de polymérisation de l'actine induit par VPR peuvent être considérés comme des inhibiteurs de la fonction
20 de VPR ayant potentiellement un effet inhibiteur du cycle réplcatif du VIH-1 agissant au niveau de la translocation cytoplasme- noyau du PIC.

La présente invention a donc pour objet un fragment ou un dérivé de VPR caractérisé en ce qu'il est capable d'induire
25 une forte augmentation de la cinétique de polymérisation de l'actine cellulaire et en ce qu'il comprend la séquence du fragment 55-75 de VPR.

Par fragment de VPR, on entend un polypeptide qui présente une longueur inférieure à celle de la protéine VPR native.

30 Avantageusement, le fragment polypeptidique selon l'invention a une longueur inférieure à 70 acides aminés, de préférence inférieure à 60 acides aminés et de manière particulièrement préférée inférieure à 50 acides aminés.

À titre d'exemple de tels fragments polypeptidiques, on
35 peut citer les fragments 52-96, 60-80 et 55-75 de VPR, de préférence le fragment 55-75.

La séquence du fragment 52-96 est donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.4.

La séquence du fragment 60-80 est donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.5.

5 On entend par dérivés de VPR, des protéines ou peptides dont la séquence est obtenue à partir celle de la protéine VPR ou de ses fragments, en supprimant, ajoutant ou modifiant un ou plusieurs acides aminés. Il peut aussi s'agir de modifications chimiques opérées à l'une ou l'autre des
10 extrémités de la protéine ou du fragment ou au niveau de la chaîne latérale d'un ou plusieurs des acides aminés. À titre d'exemple de tels dérivés, on peut citer les formes cyclisées.

La présente invention a également pour objet une méthode d'identification de composés capables d'agir sur la
15 réplication d'un virus du type VIH, caractérisée en ce que l'on analyse la polymérisation de l'actine induite par la protéine VPR, un fragment ou un dérivé de celle-ci sur une cellule ou un extrait cellulaire comprenant de l'actine, en présence dudit composé.

20 Les composés mis en évidence grâce à la méthode de l'invention constituent des composés candidats pour le développement d'inhibiteurs de la réplication des virus et donc pour le traitement du SIDA.

Avantageusement, la méthode de l'invention comprend les
25 étapes de :

(i) mise en contact, dans un milieu réactionnel, d'une cellule ou d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, de préférence d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, avec la protéine VPR, un
30 fragment ou un dérivé de celle-ci, et le composé à tester, et

(ii) analyse de la polymérisation de l'actine dans le milieu réactionnel suite à l'étape (i), de préférence au plateau (état stationnaire).

35 L'homme du métier pourra déterminer simplement les cellules ou extraits cellulaires comprenant de l'actine qui peuvent

être utilisés dans la méthode de l'invention. À titre d'exemple d'extraits cellulaires comprenant de l'actine utilisables dans la méthode de l'invention, on peut citer des extraits obtenus par la lyse, par des procédés usuels (lyse
5 mécanique ou à l'aide de tensio-actifs, éventuellement centrifugation et récupération du surnageant), de lignées cellulaires telles que des lignées de fibroblastes, notamment des fibroblastes de souris comme la lignée 3T3.

Avantageusement, la concentration protéique dudit extrait
10 cellulaire dans le milieu réactionnel est comprise entre 10 µg/ml et 10 mg/ml, de préférence entre 0,1 mg/ml et 1 mg/ml.

Par fragment ou dérivé de VPR, on entend un fragment ou un dérivé de VPR tel que décrit précédemment.

Avantageusement, la concentration de VPR, de fragment ou de
15 dérivé de celle-ci est inférieure ou égale à 50 µM dans le milieu réactionnel, de préférence inférieure ou égale à 10 µM et de manière particulièrement préférée inférieure ou égale à 5 µM. Avantageusement encore, la concentration de VPR, de fragment ou de dérivé de celle-ci est supérieure ou égale à
20 100 nM dans le milieu réactionnel, de préférence supérieure ou égale à 500 nM et de manière particulièrement préférée supérieure ou égale à 1 µM

Tout composé pourra être testé dans la méthode de l'invention. La méthode de l'invention peut être mise en œuvre
25 avec des concentrations fixes ou des concentrations variables du composé à tester. Avantageusement, les concentrations du composé à tester sont comprises entre 10 pM et 100 µM dans le milieu réactionnel, de préférence entre 100 pM et 10 µM et de manière particulièrement préférée entre 1 nM et 5 µM.

30 Avantageusement, la méthode de l'invention comprend l'analyse de la polymérisation de l'actine en présence et en absence de VPR. La méthode de l'invention comprend alors les étapes supplémentaires de:

(iii) mise en contact, dans un milieu réactionnel, d'une
35 cellule ou d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, de préférence un extrait cellulaire

comprenant de l'actine, avec le composé à tester;
et

- (iv) analyse de la polymérisation de l'actine dans le milieu réactionnel suite à l'étape (iii).

5 Ainsi et à titre d'exemple, la mise en œuvre du test peut comprendre la mesure de la dynamique de la polymérisation de l'actine cellulaire d'une part en présence de 5 μM de VPR et d'autre part en absence de VPR (contrôle).

Avantageusement encore, la méthode de l'invention comprend
10 en outre l'étape de :

- (v) comparaison des résultats de polymérisation obtenus aux étapes (ii) et (iv).

De préférence, la méthode de l'invention comprend alors une étape supplémentaire (vi) de sélection des composés permettant
15 d'inhiber la polymérisation de l'actine à l'étape (i) et de préférence pas à l'étape (iii).

Selon une deuxième forme de réalisation particulière de la méthode de l'invention, et de préférence dans le cas d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, le démarrage de la
20 polymérisation de l'actine est obtenu par l'introduction dans le milieu réactionnel d'un tampon contenant de l'ATP et du MgCl_2 . La méthode de l'invention comprend alors l'introduction dans le milieu réactionnel d'ATP et de MgCl_2 à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii). L'homme du métier pourra
25 déterminer simplement les concentrations d'ATP et de MgCl_2 à ajouter au milieu réactionnel pour obtenir le démarrage de la polymérisation de l'actine. À titre d'exemple, on peut utiliser une concentration de 500 μM d'ATP et de 1 mM de MgCl_2 dans le milieu réactionnel.

30 Avantageusement, le composé à tester est ajouté dans le milieu réactionnel à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii) avant l'induction de la polymérisation d'actine.

Le milieu réactionnel pourra également comprendre d'autres composants permettant d'améliorer la polymérisation et/ou de
35 maintenir cette activité dans le temps comme le sucrose ou encore le DTT.

Selon une troisième forme de réalisation particulière de la méthode de l'invention, la méthode de l'invention comprend en outre l'introduction dans le milieu réactionnel d'un traceur permettant de suivre la polymérisation de l'actine à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii). Un tel traceur correspond à de l'actine marqué, de préférence par un fluorophore comme l'actine G-alexa.

La cinétique de polymérisation de l'actine dans les extraits cellulaires pourra alors être mesurée en suivant l'augmentation de l'anisotropie de fluorescence (AF) à l'étape (ii) et éventuellement à l'étape (iv).

Avantageusement l'analyse de la variation d'anisotropie est mesurée en continu, par exemple dans un appareil BEACON 2000 (PANVERA).

Le paramètre de la dynamique de polymérisation d'actine mesuré dans la méthode de l'invention à l'étape (ii) et éventuellement à l'étape (iv) est alors de préférence la valeur d'anisotropie de fluorescence (AF) au plateau (état stationnaire).

Dans les conditions de mesures standard, le plateau de polarisation de fluorescence (anisotropie) est obtenu après 2 à 5 minutes d'incubation et reste stable pendant plusieurs dizaines de minutes.

Dans un souci de standardisation, les valeurs d'anisotropie sont évaluées 10 minutes après l'induction de la réaction.

Les mesures effectuées sont alors les suivantes :

- Valeur de l'AF au plateau en présence de VPR ;
- Valeur de l'AF au plateau en présence de VPR et du composé à tester ;
- Valeur de l'AF au plateau en absence de VPR ;
- Valeur de l'AF au plateau en absence de VPR et en présence du composé à tester.

Ces différentes mesures permettent de discriminer un effet inhibiteur de polymérisation d'actine, d'un effet inhibiteur de VPR (polymérisation de l'actine VPR-dépendante).

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre de la méthode décrite précédemment. Un tel kit comprend :

- un extrait ou lysat cellulaire contenant de l'actine,
- 5 - de l'actine marqué, par exemple par un fluorophore, par exemple l'actine-alexa (G-acti-alexa 488),
- un tampon de polymérisation de l'actine,
- un tampon général d'actine (tampon G : tampon de dilution de l'extrait ou lysat cellulaire contenant de l'actine),
- 10 - la protéine VPR purifiée, un fragment ou un dérivé de celle-ci,
- avantageusement un mode opératoire.

D'autres avantages et caractéristiques de la méthode de l'invention apparaîtront des exemples de qui suivent.

15 **EXEMPLES**

1) Identification des domaines peptidiques actifs sur la polymérisation de l'actine dans des extraits cellulaires.

a) Domaines peptidiques :

La figure 3 représente la structure tridimensionnelle
20 complète de VPR obtenue par RMN (Wecker et al., Eur. J. Biochem. 269, 3779-3788, 2002).

Cette structure relativement symétrique entre les domaines N et C-terminal avec trois hélices alpha structurées bien caractérisées. La structure tertiaire, en forme de trapèze
25 semble également bien stabilisée par la présence des deux "tours" en 34-36 et 52-54 malgré la présence des zones flexibles adjacentes (foncées).

Les hélices sont amphiphatiques et se caractérisent par une alternance d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes. Cette
30 architecture induit une répartition dissymétrique des résidus hydrophiles et hydrophobes comme indiqué dans la figure 4.

Il convient de noter que certains domaines ont un caractère hydrophobe marqué, telle l'hélice alpha 3 qui présente dans sa séquence 11 leucines ou isoleucines.

Afin d'obtenir des informations sur les domaines de VPR responsables de la polymérisation de l'actine, les fragments peptidiques de VPR ci-dessous ont été synthétisés :

VPR (1-96) : SEQ ID NO.1

5 VPR (1-51) : SEQ ID NO.2

VPR (70-96) : SEQ ID NO.3

VPR (52-96) : SEQ ID NO.4

VPR (60-80) : SEQ ID NO.5

VPR (55-75) : SEQ ID NO.6

10 b) Cellules et préparation des extraits.

Les fibroblastes 3T3 exprimant la protéine de fusion EWS-F11 (EF) ont été cultivés selon les techniques courantes. Cette protéine de fusion EWS-F11 (EF) est responsable du sarcome d'Ewing. Les cellules exprimant cette protéine sont
15 hautement tumorigènes et se caractérisent entre autres par une diminution significative de l'expression de la zyxine. Cette sous-expression de zyxine est accompagnée d'une forte altération de la morphologie cellulaire, de l'adhérence cellule-cellule et de la motilité.

20 Les cellules ont été lavées dans un tampon usuel. Les membranes cellulaires ont ensuite été rompues en utilisant les procédés usuels. Les extraits bruts ont alors été centrifugés à 10 000 g pendant 30 min, puis le surnageant a été filtré avec un filtre à 0,45 µm. Le surnageant a été complété avec du
25 sucrose à 150 mM final, de l'ATP et du DTT. L'extrait cellulaire obtenu a alors été aliquoté et conservé à -80°C.

c) Composition des milieux réactionnels standard.

Extraits de cellules de fibroblastes 3T3 exprimant la protéine de fusion EWS-F11 (EF): 0,20 mg/ml de protéines

30 alexa 500 µM (G-acti-alexa 488, molecular probes)

ATP : 500 µM

MgCl₂ : 1 mM

VPR ou fragments de VPR (SEQ ID NO.1 à 6): 5 µM

ou VPR de 0 à 10 μ M

d) Réaction de polymérisation de l'actine en présence de VPR :

5 Pour le test manuel, la réaction a été réalisée dans une cuvette du Beacon 2000.

10 Dans un aliquote d'extrait cellulaire, on a ajouté 1 mM d'actine-alexa. La réaction de polymérisation a été induite par l'addition d'un volume égal à celui de l'extrait d'un tampon contenant de l'ATP 1 mM et du $MgCl_2$ 2 mM. La protéine VPR a été ajoutée avant l'addition du tampon de polymérisation. La variation d'anisotropie de fluorescence a été mesurée automatiquement toutes les 30 secondes.

e) Résultats :

15 Les résultats obtenus avec la VPR sont représentés sur la figure 5. On observe une très forte augmentation de la vitesse de polymérisation de l'actine et une très forte augmentation du niveau d'actine polymérisée à l'état stationnaire.

Cet effet est bien supérieur à celui observé en présence de phalloïdine à concentration saturante.

20 Des résultats similaires ont été obtenus avec les fragments SEQ ID NO.4 et 5. En revanche, aucune modification de la polymérisation de l'actine n'est observé en présence des fragments VPR SEQ ID NO.2 et 3.

25 Les valeurs d'anisotropie de fluorescence en présence de différentes concentrations de VPR et à l'état stationnaire sont représentés sur la figure 6. Les résultats montrent que l'effet activateur de VPR sur la polymérisation de l'actine est concentration dépendante.

30 Les extraits cellulaires contiennent *a priori* tous les éléments régulateurs intervenant dans la dynamique de l'actine. De très nombreuses protéines peuvent intervenir dans ce processus. La figure 6 représente la dynamique de l'actine simplifiée intervenant au niveau cellulaire.

35 D'une manière simplifiée (figure 7), les éléments suivants peuvent être pris en compte :

1- Vitesse de polymérisation :

. La vitesse de polymérisation est dépendante de la concentration en actine G-ATP des extraits. Ce paramètre est constant dans toutes les expériences.

5 . La vitesse de polymérisation est dépendante des premières étapes de nucléation de l'actine G (formation de dimères et trimères d'actine). Dans nos conditions opératoires, ce paramètre ne semble pas intervenir dans la mesure où au départ de la réaction, la nucléation est déjà effectuée.

10 . La constante de vitesse apparente est le résultat de la vitesse de polymérisation et de la vitesse de dépolymérisation. Ce paramètre est donc indicatif de la dynamique et notamment du turnover du système.

2- Quantité d'actine F à l'état stationnaire (valeur
15 d'anisotropie au plateau). Cette valeur est le reflet des valeurs respectives de vitesse de polymérisation et dépolymérisation à l'état stationnaire. La vitesse de dépolymérisation dépend entre autres de la stabilité des filaments d'actine. Les agents connus de stabilisation de
20 l'actine F comme la phalloïdine augmentent notablement la valeur du plateau en se fixant à l'actine F et limitent ainsi sa dépolymérisation.

Pour autant, dans le cas de la protéine VPR, les résultats montrent une très forte augmentation de la quantité d'actine F
25 à l'état stationnaire et aussi de la constante de vitesse de polymérisation (figure 5), lesquelles sont bien supérieures aux valeurs obtenues avec des agents stabilisant l'actine F comme la phalloïdine. Ces fortes augmentations suggèrent un mécanisme de stabilisation de l'actine F par VPR différents de
30 celui d'agents comme la phalloïdine associé à une forte diminution de la vitesse de dépolymérisation de l'actine.

En fait, la vitesse de dépolymérisation de l'actine F dépend également de plusieurs protéines et notamment de la cofiline (figure 7), laquelle accélère fortement la
35 dépolymérisation de l'actine F. Comme nous l'avons mentionné

précédemment, l'activité de la cofiline se trouve sous le contrôle de la Lim kinase laquelle est notamment sous le contrôle de la phosphatase PP2A.

Dans le cas de VPR, les résultats suggèrent donc que
5 l'augmentation de la constante de polymérisation et de la quantité d'actine F à l'état stationnaire résultent majoritairement d'une inhibition par VPR de l'activité d'enzymes impliquées dans la dépolymérisation de l'actine F, et vraisemblablement de la colifine. On ne peut toutefois
10 écarter l'hypothèse que l'interaction décrite entre VPR et l'actine F intervienne également dans le mécanisme de stabilisation des filaments d'actine par VPR.

2) Identification des domaines peptidiques actifs sur la polymérisation de l'actine dans des extraits cellulaires.

15 L'effet de ces différents fragments peptidiques a également été sur la polymérisation de l'actine endogène des cellules 3T3 EF. Le paramètre retenu est la valeur de la quantité d'actine F présente à l'état stationnaire.

La figure 8 montre les résultats obtenus avec différentes
20 concentrations de fragments peptidiques (2,5 ou 10 μ M). Les résultats obtenus montrent que le domaine N-terminal (1-51) et le domaine extrême C-terminal (zone en partie flexible 70-96) sont inactifs sur la polymérisation de l'actine. En revanche, le fragment 52-96 est actif ainsi que le fragment 60-80. On
25 peut en déduire que le domaine actif de VPR sur la polymérisation de l'actine correspond à l'hélice alpha 3 (55-83) et ceci, aussi bien dans les extraits cellulaires que dans les cellules. Ce résultat a été confirmé par la transfection du fragment peptidique 55-75, laquelle a entraîné une
30 stimulation de la polymérisation de l'actine. Ces résultats confirment ceux obtenus au cours des expériences réalisées *in vitro* décrites précédemment.

Il convient de remarquer que la protéine virale de nucléocapside NCp7 qui est également une protéine virale
35 basique présente dans le complexe de préintégration, exerce un

effet plus faible que VPR, mais significatif sur la dynamique de polymérisation l'actine.

3) Test de criblage d'inhibiteurs de VPR.

a) Rappel

5 VPR exerce in vitro une forte augmentation de la cinétique de polymérisation de l'actine cellulaire présente dans des extraits de fibroblastes. Cet effet est considéré comme une activité fonctionnelle de VPR impliquée dans le processus de translocation cytoplasme-noyau du complexe de préintégration
10 du VIH-1 dans les cellules quiescentes infectées par le virus.

Les agents inhibiteurs de la polymérisation d'actine induite par VPR peuvent par conséquent être considérés comme des inhibiteurs de la fonction de VPR ayant potentiellement un effet inhibiteur du cycle réplcatif du VIH-1 agissant au
15 niveau de la translocation cytoplasme- noyau du PIC.

b) Principe du test

L'actine cellulaire est obtenue par la préparation d'extraits de fibroblastes de souris.

20 La cinétique de polymérisation de l'actine des extraits cellulaires est mesurée par l'augmentation de l'anisotropie de fluorescence d'actine G-alexa utilisée comme traceur et ajoutée dans les extraits cellulaires.

Pour la mise en œuvre du test, la dynamique de la polymérisation de l'actine cellulaire est mesurée d'une part
25 en présence de 5 μ M de VPR et d'autre part en absence de VPR (contrôle).

Le démarrage de la polymérisation d'actine est obtenu par l'introduction dans le milieu réactionnel d'un tampon contenant 500 μ M d'ATP et 1 mM de $MgCl_2$.

30 La molécule à tester est ajoutée à concentration fixe ou à concentration variable dans le milieu réactionnel avant l'induction de la polymérisation d'actine.

La variation d'anisotropie est mesurée en continue dans un appareil BEACON 2000 (PanVera).

Le paramètre de la dynamique de polymérisation d'actine mesuré dans le test est la valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau (état stationnaire).

5 Dans les conditions de mesures standard, le plateau de polarisation de fluorescence (anisotropie) est obtenu après 2 à 5 minutes d'incubation et reste stable pendant plusieurs dizaines de minutes.

Dans un souci de standardisation, les valeurs d'anisotropie seront évaluées 10 minutes après l'induction de la réaction.

10 Les mesures effectuées sont les suivantes :

Valeur de l'AF au plateau en présence de VPR

Valeur de l'AF au plateau en présence de VPR + la molécule à tester

Valeur de l'AF au plateau en absence de VPR

15 Valeur de l'AF au plateau en absence de VPR + la molécule à tester

Cela permet de discriminer un effet inhibiteur de polymérisation d'actine d'un effet inhibiteur de VPR (polymérisation de l'actine VPR-dépendante).

20 c) Réalisation pratique du test

- Cellules et préparation des extraits :

25 Des fibroblastes 3T3 ont été cultivés selon les techniques courantes. Les cellules ont été lavées dans du tampon Krebs pH 7.40 sans calcium. Les membranes cellulaires ont ensuite été rompues en utilisant les procédés usuels. Les extraits bruts ont été centrifugés à 10.000 g pendant 30 min. La concentration protéique du surnageant obtenu a été ajustée à 0,40 mg/ml puis le surnageant a été aliquoté et conservé à -80°C.

30 - Composition des milieux réactionnels :

Extraits de cellules de fibroblastes 3T3 : 0,20 mg/ml de protéines

Actine-alexa 500 μ M (G-acti-alexa 488, molecular probes)

ATP : 500 μ M

MgCl₂ : 1 mM

VPR : 5 μ M

pour le test manuel, des concentrations variables des
5 molécules à tester ont été utilisées (max 5 μ M) .

Molécule à tester : 5 μ M pour un test robotisé

d) Mesure de la dynamique de polymérisation

- Expérience contrôle sans VPR :

Pour le test manuel, la réaction a été réalisée dans une
10 cuvette du Beacon 2000.

1 mM d'actine-alexa a été ajouté dans un aliquote d'extrait
cellulaire. La réaction de polymérisation a ensuite été
induite par l'addition d'un volume égal à celui de l'extrait
d'un tampon contenant ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM. La variation
15 d'anisotropie de fluorescence a ensuite été mesurée
automatiquement toutes les 30 secondes.

- Expérience contrôle avec VPR :

La séquence des opérations était identique à celle
précédemment décrite en présence d'une concentration finale de
20 VPR de 5 μ M. La protéine VPR a été ajoutée avant l'addition du
tampon de polymérisation.

- Expérience en présence de molécule à tester :

Les conditions expérimentales et la séquence des opérations
étaient identiques aux expériences contrôles en présence de
25 concentrations variables de molécules à tester (ajouter avec
VPR avant l'induction de la polymérisation d'actine).

Afin de valider le principe de la méthode d'identification
d'agents inhibiteurs de la polymérisation de l'actine induite
par VPR, de la phalloïdine (5 μ M, Sigma) a été utilisé à titre
30 de contrôle négatif (inhibiteur de la polymérisation de
l'actine non VPR dépendant) et un anticorps de lapin
polyclonal dirigé contre le fragment 55-75 de VPR a été
utilisé (dilution finale 1/1000) à titre de contrôle positif

(inhibiteur spécifique de la polymérisation de l'actine VPR-dépendante).

e) Test robotisé

5 Le test est adaptable à la robotisation en utilisant des plaques de 96 puits. Dans ce cas, les molécules testées sont ajoutées à la concentration finale de 5 μM .

REVENDICATIONS

1) Fragment ou dérivé de VPR caractérisé en ce qu'il est capable d'induire une forte augmentation de la cinétique de polymérisation de l'actine cellulaire et en ce qu'il comprend la séquence du fragment 55-75 de VPR (SEQ ID NO.6).

2) Fragment de VPR selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il présente une longueur inférieure à 70 acides aminés, de préférence inférieure à 60 acides aminés.

3) Fragment selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué des fragments 52-96 (SEQ ID NO.4), 60-80 (SEQ ID NO.5) et 55-75 (SEQ ID NO.6) de VPR.

4) Méthode d'identification de composés capables d'agir sur la réplication d'un virus du type VIH caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

(i) mise en contact, dans un milieu réactionnel, d'une cellule ou d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, de préférence d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, avec la protéine VPR, un fragment ou un dérivé de celle-ci, et le composé à tester, et

(ii) analyse de la polymérisation de l'actine dans le milieu réactionnel suite à l'étape (i).

5) Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit fragment ou dérivé de VPR comprend la séquence du fragment 55-75 de VPR (SEQ ID NO.6).

6) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre les étapes de :

(iii) mise en contact, dans un milieu réactionnel, d'une cellule ou d'un extrait cellulaire comprenant de l'actine, de préférence un extrait cellulaire comprenant de l'actine, avec le composé à tester ; et

(iv) analyse de la polymérisation de l'actine dans le milieu réactionnel suite à l'étape (iii).

7) Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre l'étape de :

5 (v) comparaison des résultats de polymérisation obtenus aux étapes (ii) et (iv).

8) Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape de :

10 (vi) sélection des composés permettant d'inhiber la polymérisation de l'actine à l'étape (i) et de préférence pas à l'étape (iii).

15 9) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que la concentration de VPR, de fragment ou de dérivé de celle-ci est inférieure ou égale à 50 μM , de préférence inférieure ou égale à 10 μM .

20 10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, caractérisée en ce que la méthode de l'invention les concentrations du composé à tester sont comprises entre 10 pM et 100 μM dans le milieu réactionnel, de préférence entre 100 pM et 10 μM .

11) Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle est mise en œuvre avec des concentrations fixes ou des concentrations variables du composé à tester.

25 12) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 11, caractérisée en ce que le démarrage de la polymérisation d'actine est obtenu par l'introduction dans le milieu réactionnel d'ATP et de MgCl_2 à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii).

30 13) Méthode selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé à tester est ajouté dans le milieu réactionnel à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii) avant l'induction de la polymérisation de l'actine.

14) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre

l'introduction dans le milieu réactionnel d'un traceur permettant de suivre la polymérisation de l'actine à l'étape (i) et éventuellement à l'étape (iii), et ce que ledit traceur correspond à de l'actine marqué, de préférence par un fluorophore.

15) Méthode selon la revendication 14, caractérisé en ce que le traceur correspond à de l'actine marqué par à un fluorophore et en ce que l'analyse de la polymérisation de l'actine est effectuée en mesurant en suivant l'anisotropie de fluorescence (AF) à l'étape (ii) et éventuellement à l'étape (iv).

16) Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 15, caractérisée en ce que le paramètre de la polymérisation d'actine mesuré est la valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau (état stationnaire).

1/6

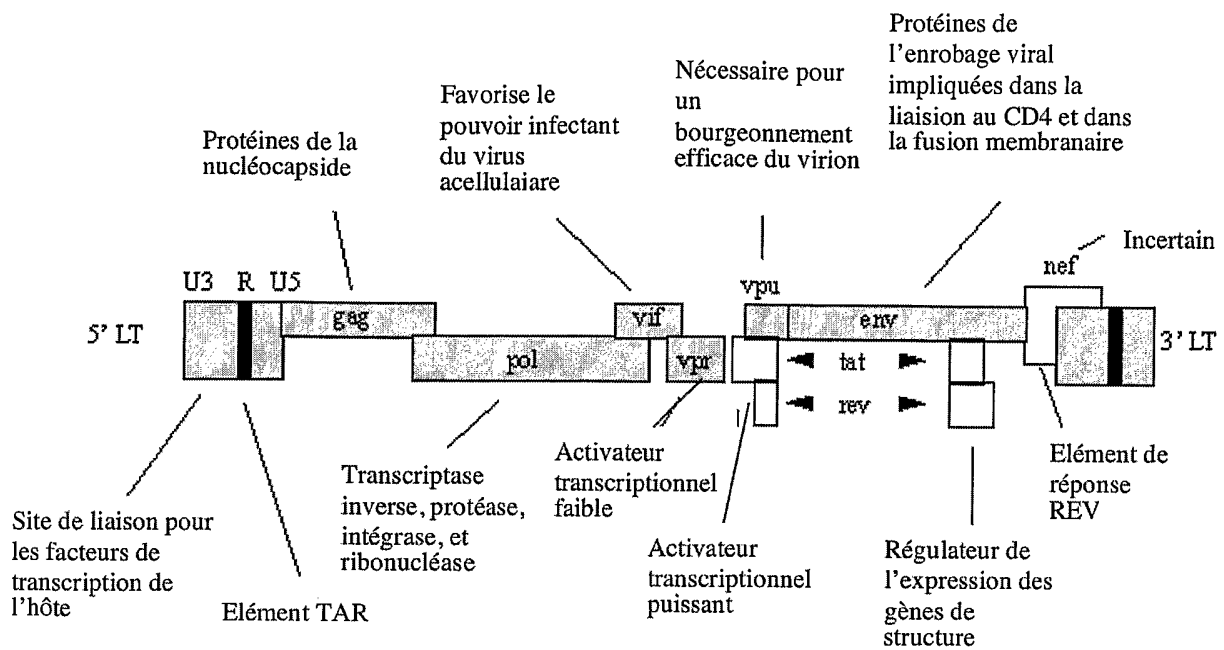


Figure 1

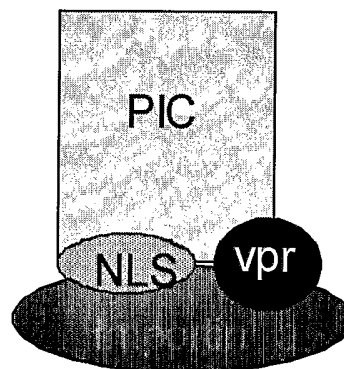


Figure 2

2/6

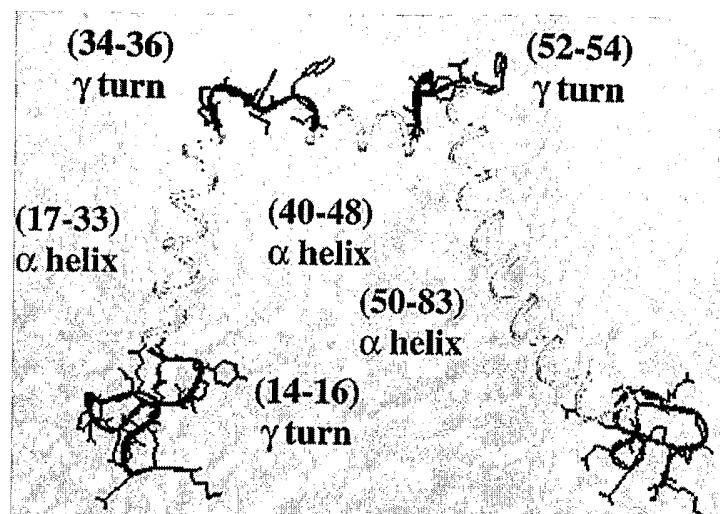


Figure 3

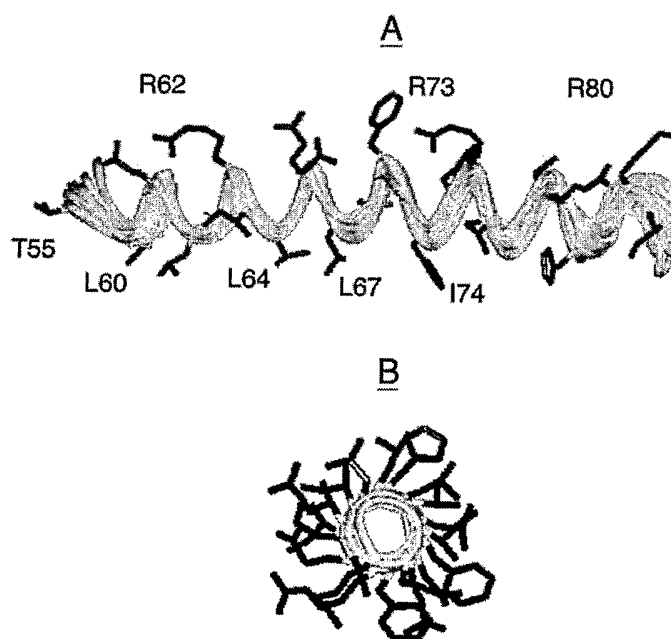


Figure 4

3/6

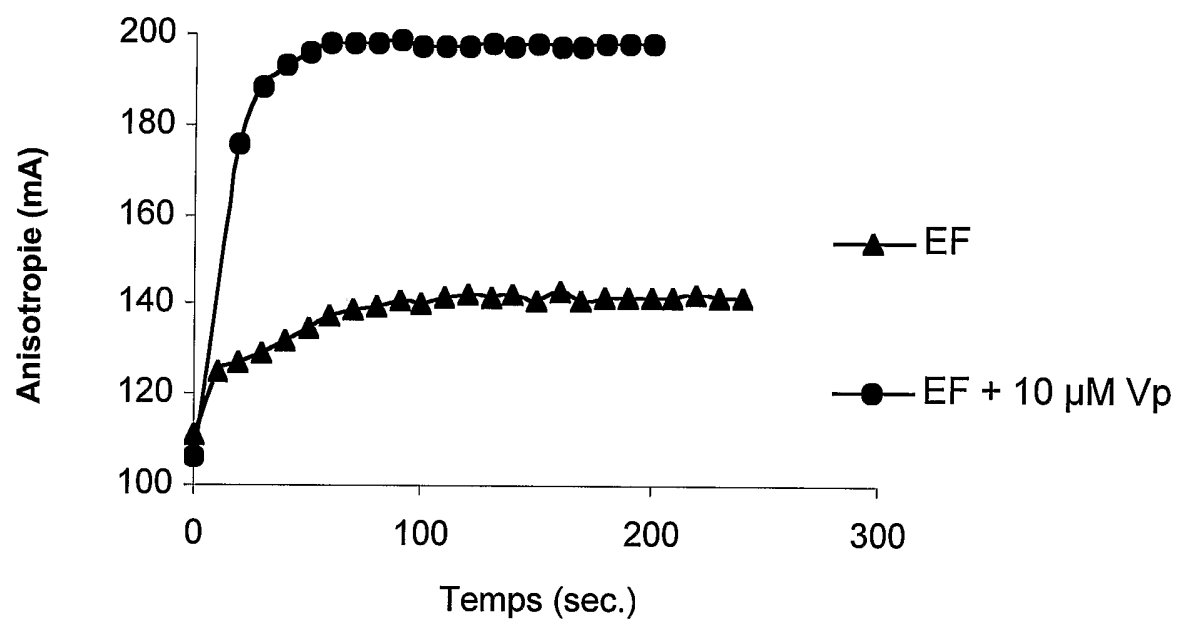


Figure 5

4 / 6

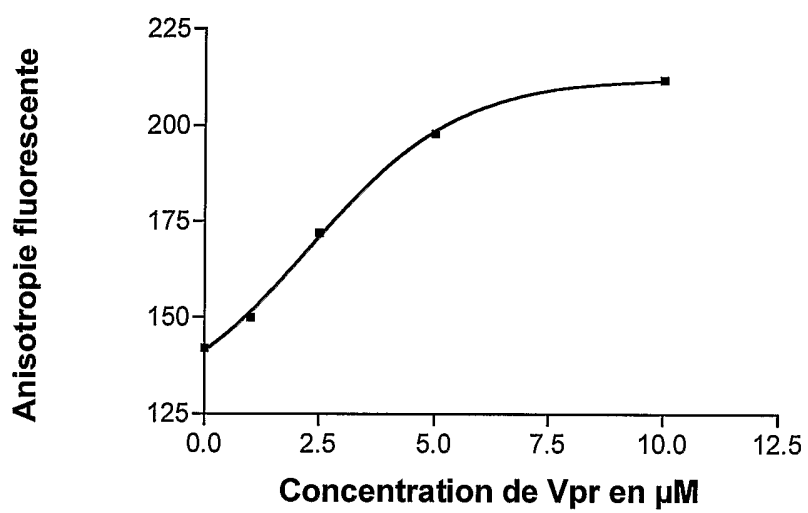


Figure 6

5/6

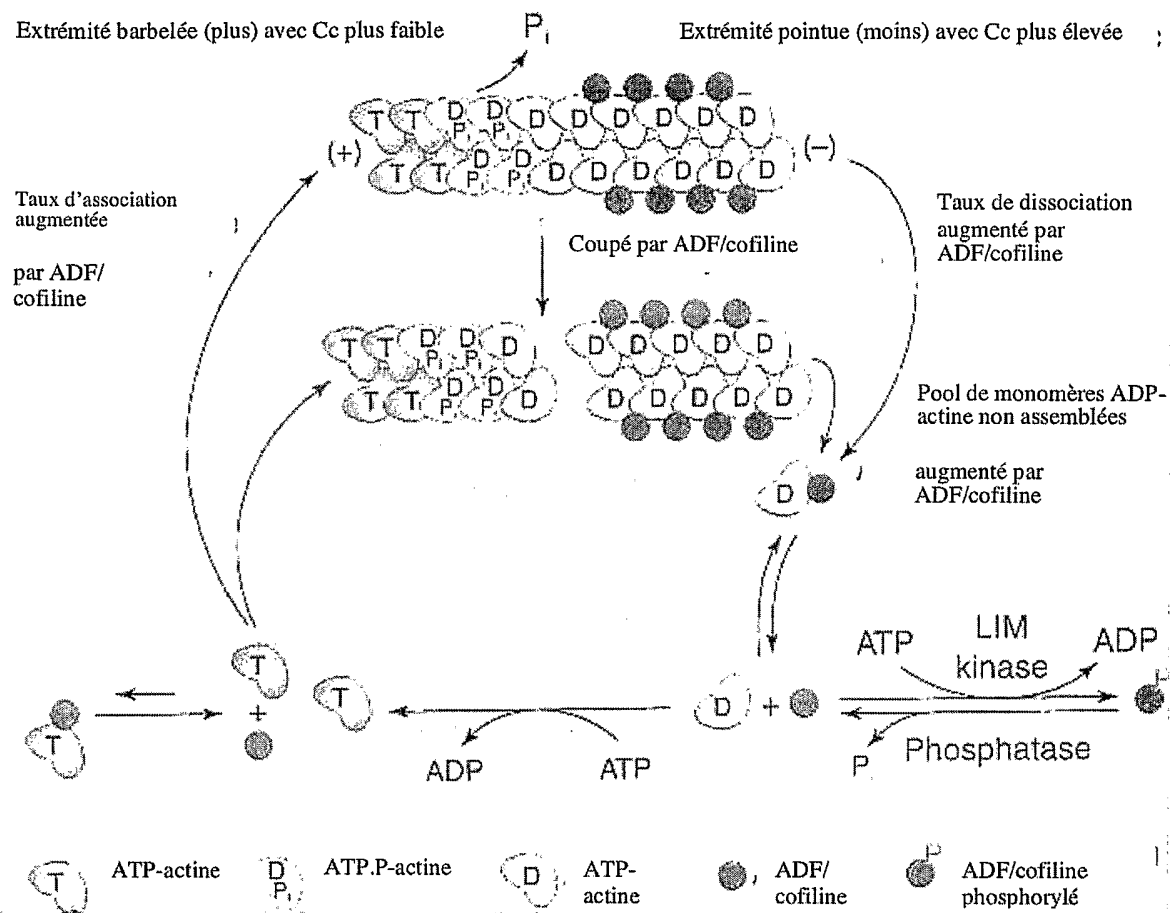


Figure 7

6/6

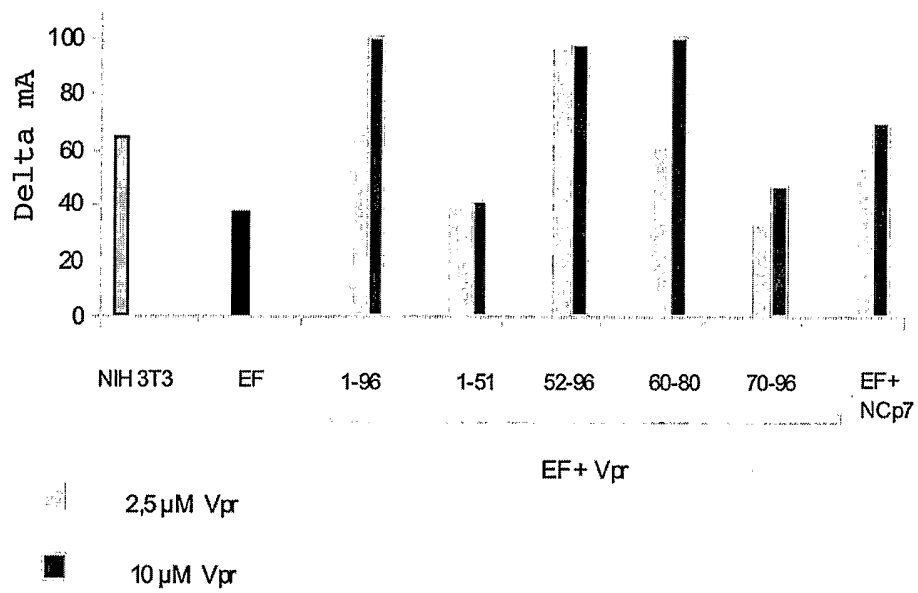


Figure 8

SEQUENCE LISTING

<110> Bioalliance Pharma
 Ecole Normale Supérieure Cachan - ENS Cachan
 Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS

<120> Méthode d'identification de composés actifs sur la réplication
 du virus VIH

<130> 34246/PCT

<140> PCT/FR05/XXXXX
 <141> 2005-04-11

<150> FR04/03782
 <151> 2004-04-09

<150> FR04/03783
 <151> 2004-04-09

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(96)
 <223> Fragment peptidique de la Vpr (1-96)

<400> 1

Met	Glu	Gln	Ala	Pro	Glu	Asp	Gln	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Pro	Tyr	Asn
1				5				10					15		
Asp	Trp	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Asn	Glu	Ala	Val	Arg
			20					25					30		
His	Phe	Pro	Arg	Ile	Trp	Leu	His	Ser	Leu	Gly	Gln	His	Ile	Tyr	Glu
			35				40					45			
Thr	Tyr	Gly	Asp	Thr	Trp	Thr	Gly	Val	Glu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Leu
	50					55					60				
Gln	Gln	Leu	Leu	Phe	Ile	His	Phe	Arg	Ile	Gly	Cys	Arg	His	Ser	Arg
65					70					75				80	
Ile	Gly	Ile	Ile	Gln	Gln	Arg	Arg	Thr	Arg	Asn	Gly	Ala	Ser	Lys	Ser
				85					90					95	

<210> 2
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(51)
 <223> Fragment peptidique de la Vpr (1-51)

<400> 2

Met Glu Gln Ala Pro Glu Asp Gln Gly Pro Gln Arg Glu Pro Tyr Asn
 1 5 10 15

Asp Trp Thr Leu Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Asn Glu Ala Val Arg
 20 25 30

His Phe Pro Arg Ile Trp Leu His Ser Leu Gly Gln His Ile Tyr Glu
 35 40 45

Thr Tyr Gly
 50

<210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(27)
 <223> Fragment peptidique de la Vpr (70-96)

<400> 3

Ile His Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln
 1 5 10 15

Gln Arg Arg Thr Arg Asn Gly Ala Ser Lys Ser
 20 25

<210> 4
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(45)

<223> Fragment peptidique de la Vpr (52-96)

<400> 4

Asp Thr Trp Thr Gly Val Glu Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu
1 5 10 15

Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg Asn Gly Ala Ser Lys Ser
35 40 45

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Fragment peptidique de la Vpr (60-80)

<400> 5

Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly
1 5 10 15

Cys Arg His Ser Arg
20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Fragment peptidique de la Vpr (55-75)

<400> 6

Thr Gly Val Glu Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly
20