



Régulation de l'activité de la protéine Rev du HIV-1 par des modifications post-traductionnelles et inhibition de sa fonction par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire

Anne-Laure Vitte

► To cite this version:

Anne-Laure Vitte. Régulation de l'activité de la protéine Rev du HIV-1 par des modifications post-traductionnelles et inhibition de sa fonction par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2006. Français. <tel-00130625>

HAL Id: tel-00130625

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00130625>

Submitted on 13 Feb 2007

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

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

N° ordre : 392

N° attribué par la bibliothèque : 06ENSL0392

THESE

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la Vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

Ecole doctorale de : Biologie Moléculaire, Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 11/12/2006

Par Mademoiselle VITTE Anne-Laure

TITRE :

Régulation de l'activité de la protéine Rev du HIV-1 par des modifications post-traductionnelles et inhibition de sa fonction par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire

Directeur de thèse : Pierre JALINOT

*Après avis de : Monsieur Serge BENICHOU, Membre/Rapporteur
Monsieur Frédéric HEITZ, Membre/Rapporteur*

*Devant la commission d'examen formée de :
Pascal CLAYETTE, Membre
Evelyne MANET, Membre
Monsieur Pierre JALINOT, Membre
Monsieur Serge BENICHOU, Membre/Rapporteur
Monsieur Frédéric HEITZ, Membre/Rapporteur*

Remerciements

Je m'étais promis de terminer ce manuscrit par ces quelques lignes qui, paradoxalement, seront les premières à être lues. Cette dernière page marque pour moi la fin d'une période de ma vie riche en événements et durant laquelle j'ai beaucoup appris, professionnellement bien entendu, mais également sur moi-même, sur les autres, et sur mes valeurs. On a rarement l'occasion de remercier individuellement toutes les personnes que nous apprécions et qui nous aident à leur manière à avancer. Cela se limite trop souvent à un timide « merci ! », et c'est pourquoi je profite de cette page qui m'est offerte pour le faire vraiment.

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Pierre Jalinot, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire avant ma thèse déjà, et pour m'avoir fait confiance et impliquée dans ce projet de grande envergure.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Serge Bénichou et Monsieur Frédéric Heitz, pour avoir accepté de participer à l'écriture de ce manuscrit et à mon jury. Je remercie Monsieur Pascal Clayette et Madame Evelyne Manet, qui m'ont également fait le plaisir d'accepter de faire partie de mon jury.

Côté labo, il y a plein de personnes auxquelles je pense, et qui feront de ces quelques années un très bon souvenir. Je tiens particulièrement à remercier « le bureau 141 », qui normalement contient 4 personnes, mais qui régulièrement en accueille beaucoup plus pour les « pauses café »...même si, je sais, je n'en prenais jamais !....

Il y a donc Olivier, le « plus jeune », en terme d'arrivant seulement (!), qui a ajouté à ma dernière année passée ici une note de fraîcheur et d'humour, et qui surtout, m'a beaucoup aidé pour la suite de ma carrière : Je te dois beaucoup, Olivier.....

Ensuite, il y a Jean-Philippe, celui qui, le premier, a vu débarqué dans son bureau une stagiaire toute timide et ne savant pas trop « manipuler »....Un immense merci, JP, pour m'avoir accueillie les bras ouverts sans hésiter, et pour m'avoir montré patiemment pas mal de techniques, qui m'ont permis d'en arriver là... Un grand merci pour ton amitié, pour ton soutien, pour nos sourires, nos coups de gueule et nos états d'âme échangés sur internet. Tu es aussi une leçon de courage et de force pour moi, et ton amitié me manquera...je t'attends ailleurs pour une sortie en parapente ????

Enfin, il y a Armelle. Je crois que même les mots ne suffiront pas à te remercier suffisamment. Tu as été celle qui partageait mes joies et mes peines, celle qui m'encourageait à persévérer, celle qui m'a toujours écoutée, conseillée, consolée, nourrie même ! Tu as souvent été, sans le savoir, une des raisons pour lesquelles je venais au labo....juste pour discuter !!! Sans ta présence, ta sagesse et ton soutien, je ne suis pas sûre que je serais là, aujourd'hui, en train de rédiger ces quelques lignes pour clore mon manuscrit de thèse. Mille merci.

Un petit merci également à un « ex » de l'équipe Jalinot, Arnaud, pour son amitié et son sourire toujours présents, et qui a également contribué à la rédaction de ce manuscrit, par son soutien et ses précieux conseils de quelqu'un qui « vient juste de passer par là » !...

Je vais prendre également un peu de place pour remercier les membres de ma famille, qui bien évidemment m'ont soutenue du début à la fin, et surtout dans cette dernière ligne droite qui finalement a été pas mal déviée....(!)

Un grand merci à mon beau frère, Stéphane, qui a toujours répondu présent à mes appels désespérés, à cause des mes problèmes informatiques...Tu m'as évité pas mal de nuits blanches et de week-end à venir bosser pour récupérer le temps perdu !...

Merci à mes deux frangines, Séverine et Stéphanie, mes « deux moitiés » qui, malgré la distance, sont toujours près de moi. Merci pour votre amour, votre compréhension, et votre soutien sans faille.

Merci à Nico, mon autre beau-frère, qui sait faire des moments passés ensemble des instants de pur bonheur et de joie, en toute simplicité.... Et il y a des jours où tes sourires et tes blagues étaient vraiment les bienvenus !

Je tiens bien sûr à remercier celui qui, depuis quelques années déjà, partage mon quotidien, malgré tout (!) : David. Tu es pour moi, quoique tu penses, un soutien moral évident par ta confiance en moi, parfois exagérée à mon goût, mais qui a souvent réussi justement à me redonner confiance. Tu m'as appris à croire en moi quelles que soient les circonstances : j'ai fait des progrès, non ? A toi aussi de prendre ce même chemin et d'appliquer tes théories.... « on apprend beaucoup plus de ses échecs que de ses succès, l'important est de savoir comment et par quel moyen ! »

Enfin, merci à nos deux rayons de soleil ! Manon, ma fille, mon soleil, ma joie de vivre, mon petit cœur, ma chérie... qui m'accueille chaque matin avec un câlin, et s'endort le soir avec un « Je t'aime ». Ton amour si simple et tellement fort me donne la volonté de persévérer et d'avancer, pour pouvoir t'offrir une jolie vie....Théo, petit bout de chou qui commence à grandir, mon premier neveu, et enfin un cousin pour Manon !.... Ils sont encore trop petits pour comprendre combien leur présence nous remplit de bonheur....mais comment faisait-on sans vous, avant ?

Je garde le meilleur pour la fin Papa, Maman, pour vous non plus, il n'y a pas assez de mots pour dire combien votre présence m'est essentielle. Depuis tout le temps et en toute circonstance, vous m'avez soutenue, comprise, aidée, félicitée...bref, chaque jour est une nouvelle occasion de me prouver votre amour sans limite et sans préjugés, « en toute simplicité »....Vous m'avez appris qu'il faut savoir faire des choix, les assumer et les respecter, mais surtout qu'il faut savoir partager....

Et pour terminer ces quelques lignes, je voudrais te rappeler, Maman, qu'il y a quelques mois tu m'as envoyé une carte sur laquelle était inscrit un proverbe de Leibnitz : « *Le bonheur, c'est se réjouir du bonheur d'autrui, c'est faire du bonheur d'un autre le sien propre* »il a tellement raison !....

A mes parents,

Sommaire

INTRODUCTION.....	8
<i>I. Biologie du HIV-1.....</i>	<i>9</i>
I.1. Découverte et origine	9
I.2. Epidémiologie et transmission	10
I.3. Pathologie du HIV-1	12
I.4. Morphologie du virion	13
I.5. Cycle viral	15
I.5.1. Phase précoce : du virus (ARN) au provirus (ADN)	15
I.5.2. Phase tardive : du provirus aux nouveaux virions	16
I.6. Le génome viral.....	18
I.6.1. Organisation du génome.....	19
I.6.2. Les protéines virales.....	20
<i>II. Régulation de l'activité des protéines par des modifications post-traductionnelles.....</i>	<i>28</i>
II.1. L'ubiquitine, un signal aux multiples facettes	29
II.1.1. Synthèse et activation.....	29
II.1.2. Rôles de l'ubiquitylation	32
II.2. Les protéines SUMO.....	38
II.2.1. Synthèse et activation.....	39
II.2.2. Rôles de la sumoylation	41
II.3. Exemples de pathologies liés aux systèmes ubiquitine et SUMO et de leur utilisation par des virus..	44
II.3.1. Pathologies associée aux systèmes ubiquitine ou SUMO	45
II.3.2. Modulation de l'infection virale grâce aux systèmes ubiquitine et SUMO.....	46
<i>III. Mécanismes d'action et régulation des protéines Tat et Rev du HIV-1</i>	<i>55</i>
III.1. La protéine Tat	55
III.1.1. Domaines fonctionnels	55
III.1.2. Tat et la transcription du génome viral	59
III.1.3. Autres fonctions de Tat.....	63
III.1.4. Régulation de la fonction Tat par des modifications post-traductionnelles	68
III.1.5. Inhibition de la fonction Tat	71
III.2. La protéine Rev	75
III.2.1. Domaines fonctionnels de Rev	79
III.2.2. Caractéristiques des ARNm viraux dépendants de Rev.....	85
III.2.3. Fixation de Rev sur les ARNm viraux	88
III.2.4. Rôle de Rev sur l'expression des ARNm viraux non ou partiellement épissés	91
III.2.5. Les partenaires cellulaires de Rev.....	93
III.2.6. Le cycle de transport nucléaire de Rev	104
III.2.7. Rev et la pathogenèse du HIV-1	113
III.2.8. Inhibition de la fonction Rev	114
<i>IV. Problématique du travail de thèse.....</i>	<i>123</i>
IV.1. Inhibition de la fonction Rev par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire.....	123
IV.2. Régulation de la fonction Rev par l'ubiquitine et par SUMO	126

RESULTATS..... 127

<i>I. Inhibition de la fonction Rev par les SHPR</i>	128
I.1. Mécanismes d'action des SHPR.....	128
I.1.1. Les SHPR n'interfèrent pas avec l'interaction Rev/ RRE	128
I.1.2. Les SHPR n'entrent pas en compétition avec hCRM1 pour la liaison sur Rev	131
I.1.3. Les SHPR n'affectent pas la localisation de Rev dans la cellule.....	135
I.1.4. Les SHPR déstabilisent la protéine Rev dans les cellules	139
I.1.5. Les SHPR s'accumulent dans les noyaux des cellules transfectées	144
I.2. Optimisation des propriétés des SHPR.....	145
I.2.1. Augmentation du pouvoir inhibiteur du SHPR190.....	150
I.2.2. Optimisation de la pénétration intracellulaire du SHPR190.....	159
I.2.3. Stabilité du SHPR190 et de ses variants.....	168
I.3. Mécanismes de pénétration du SHPR190	171
I.3.1. Etude de l'internalisation des SHPR à travers la membrane cellulaire	171
I.3.2. Analyse comparative de différents domaines de pénétration(PTD)	178
<i>II. Régulation de la fonction Rev par l'ubiquitine et SUMO</i>	187
II.1. Rev et l'ubiquitine	187
II.1.1. Rev est modifiée par l'ubiquitine	187
II.1.2. Cartographie de la Lysine de Rev permettant la liaison de l'ubiquitine.....	192
II.1.3. Cartographie des lysines de l'ubiquitine impliquées dans sa fixation sur Rev.....	194
II.1.4. L'ubiquitylation de Rev n'affecte pas sa localisation intracellulaire mais module son activité.	196
II.2. Rev et SUMO-1	201
II.2.1. Rev n'est pas régulée par SUMO-1.....	201
II.2.2. Rev n'est pas modifiée par SUMO-1	201
II.3. Conclusions.....	204

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 205

<i>Préambule</i>	206
<i>I. Bilan de l'étude des propriétés inhibitrices des SHPR</i>	207
I.1. Mécanisme d'action des SHPR	207
I.1.1. Dégradation par le protéasome	208
I.1.2. Autres mécanismes d'action?	210
I.2. Optimisation des propriétés du SHPR190.....	211
I.2.1. Bilan des différentes mutations	211
I.2.2. Vers une molécule SHPR optimale.....	214
I.3. Mécanismes de pénétration des SHPR	215
I.3.1. Le SHPR190 diffuse de manière passive à travers les membranes plasmiques.....	215
I.3.2. L'affinité pour les membranes cellulaires dépend de la nature du PTD.....	220
I.3.3. Conclusions.....	222
<i>II. Bilan de l'étude de la régulation de Rev par l'ubiquitine et SUMO-1</i>	224
II.1. Rev et l'ubiquitine	224
II.1.1. Rev est polyubiquitylée dans des cellules transfectées	224
II.1.2. Les formes polyubiquitylées de Rev sont plus stables mais moins actives dans la cellule	225
II.1.3. Rôles des chaînes d'ubiquitine K33 et K27 sur les substrats	227
II.2. Rev et SUMO-1	228
II.3. Autres modifications de Rev?	229

BIBLIOGRAPHIE..... 231**ANNEXE.....** Erreur ! Signet non défini.

Principales abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Cter	Carboxy-terminal
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HIV	Virus de l'Immunodéficience Humaine
HTLV	Virus de la Leucémie T Humaine
I κ -B	Inhibiteur de NF- κ B
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
MVB	Corps MultiVésiculaires (<i>MultiVesicular Bodies</i>)
LTR	Longue Région Terminale
NES	Signal d'Export Nucléaire
NF- κ B	Nuclear Factor of κ Ig-chain in B lymphocytes
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
NPC	Complexe du Pore Nucléaire
Nter	Amino-terminal
Nup	Nucléopore
PIC	Complexe de pré-intégration chez les lentivirus
PTD	Domaine de Transduction Protéique
RBD	Domaine de liaison à l'ARN (<i>RNA Binding Domain</i>)
RRE	Element de Réponse à la protéine Rev du HIV-1
SA	Site accepteur d'épissage
SD	Site donneur d'épissage
SHP	SUMO Heptapeptide Protein Transduction Domain
SIDA	Syndrôme de l'ImmunoDéficience Acquise
SUMO	Small Ubiquitin-related MOdifier
TAR	Element de Réponse à la protéine Tat du HIV-1
T CD4 ⁺	Lymphocytes T auxiliaires (exprimant CD4)
5' UTR	Région 5' non traduite

INTRODUCTION

I. Biologie du HIV-1

I.1. Découverte et origine

Le virus de l'immunodéficience humaine ou HIV est un rétrovirus humain du genre lentivirus. Ce virus est responsable de pathologies à évolutions lentes rassemblées sous le nom de « Syndrome de l'Immunodéficience Acquise » ou SIDA. Il existe deux types de HIV, le HIV-1 et le HIV-2, présentant environ 42% d'homologie au niveau de leur génome, mais différents entre autres par leur taux de transmission, leur virulence, et les réponses immunitaires qu'ils déclenchent.

Le syndrome du SIDA, résultant d'une infection par le HIV-1, a été mis en évidence en 1981 après le recensement aux Etats-Unis d'un petit nombre d'hommes homosexuels présentant différents symptômes communs. Parmi ceux-ci, des pneumonies à *Pneumocystis carinii* (champignon) et un type de cancer, le sarcome de Kaposi, sont tous deux liés à un état d'immunodépression profonde. Par la suite, d'autres groupes souffrant des mêmes symptômes rejoignent le groupe des homosexuels, comme les toxicomanes par injection intraveineuse d'héroïne et les hémophiles. Les examens de laboratoire révèlent alors chez tous les malades un effondrement de l'immunité cellulaire, caractérisé principalement par la quasi disparition des cellules à rôle central dans l'immunité, les lymphocytes T auxiliaires (T CD4+). L'existence d'un réel problème sanitaire est alors avérée. La transmission par voie sexuelle et par voie sanguine laisse suspecter une origine virale du SIDA, et le professeur Robert Gallo, qui a découvert en 1980 le premier rétrovirus humain HTLV-1, considère ce dernier comme la cause probable du SIDA. Cependant, des observations microscopiques du virus isolé ainsi que des analyses immunologiques révèlent l'identification d'un nouveau virus, non transformant comme le HTLV-1, mais attaquant les lymphocytes T pour les détruire, le virus HIV-1 (Barre-Sinoussi et al., 1983 ; Gallo et al., 1983).

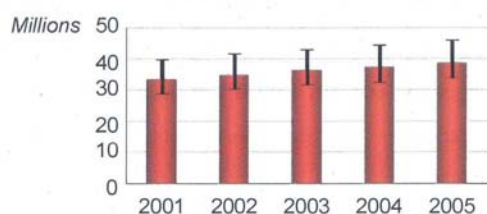
Il a été montré que l'épidémie de SIDA est le résultat d'une zoonose virale (Hahn et al., 2000), et des analyses phylogénétiques indiquent de nombreux événements de transmission inter-espèces entre des souches virales simiennes de type SIV (*S*imian *I*mmunodéficience Virus) et l'être humain. L'émergence du HIV-1 semble donc provenir

d'une transmission entre l'Homme et le chimpanzé, qui peut être expliquée par la cohabitation géographique des deux espèces.

1.2. Epidémiologie et transmission

Depuis 1981, le HIV a infecté plus de 50 millions de personnes, soit 1 à 2% de la population mondiale, et en a tué plus de 17 millions (ONUSIDA and OMS, 2006). Chaque jour, on ne recense pas moins de 11 000 nouveaux cas d'infection par le HIV, dont 10% d'enfants de moins de 15 ans et environ 50% de femmes. A l'heure actuelle, le nombre de personnes vivant avec le HIV est estimé à environ 39 millions, dont près de 25 millions vivent en Afrique subsaharienne, berceau de la maladie, et plus de 7 millions en Asie (**Figure 1**). Il est également important de noter que 95% des nouveaux cas d'infection ont lieu dans les pays à revenu faible et moyen. Dans ces pays, les malades ne peuvent pas avoir accès aux traitements disponibles ainsi qu'à un suivi de prévention suffisant pour permettre de ralentir la pandémie.

Evolution du nombre de personnes vivant avec le HIV-1 entre 2001 et 2005



Estimation du nombre de personnes vivant actuellement avec le SIDA (2005)

Afrique Sub-saharienne	24,5 millions
Asie du Sud et Sud-Est	7,6 millions
Amérique Latine	1,6 millions
Europe de l'Est et Asie centrale	1,5 millions
Amérique du Nord	1,3 millions
Europe de l'ouest et centrale	720 000
Asie de l'Est	680 000
Afrique du Nord	440 000
Carraïbes	330 000
Océanie	78 000
TOTAL	38,6 millions

Figure 1 : L'épidémie de SIDA dans le monde.

Quelques chiffres marquants de l'épidémie de SIDA d'après les données statistiques de l'OMS (2005).

Le virus peut être isolé de la plupart des liquides biologiques dont le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel. C'est un virus fragile qui ne peut se transmettre qu'à l'occasion de contacts interhumains rapprochés. La transmission par voie sexuelle est le mode de contamination le plus fréquent (70 à 80 % des cas d'infection).

Elle peut s'effectuer au cours de rapports homosexuels ou hétérosexuels, et le risque de transmission augmente en cas de partenaires multiples ou de maladies sexuellement transmissibles (MST). La seconde voie d'infection est la transmission par voie sanguine, entre toxicomanes (40% des cas d'infection), ou lors d'accidents professionnels (risque estimé à 0.4%). La contamination au cours d'une transfusion sanguine est désormais minimisée par un dépistage systématique des dons du sang (risque résiduel estimé à 1 cas sur 500 000). Enfin, la transmission materno-fœtale représente un taux de risque de 13 à 20%, qui dépend avant tout de la charge virale de la mère. Cette transmission peut se faire *in utero* dans les deux derniers mois de la grossesse (35% des cas), mais surtout lors de l'accouchement (65% des cas). La contamination par l'allaitement maternel représente également un facteur de risque, et particulièrement en Afrique où les mères ne disposent pas ou ne veulent pas de lait de substitut.

1.3. Pathologie du HIV-1

Suite à son entrée dans l'organisme, le HIV-1 entraîne une infection irréversible et chronique, puisqu'il ne cesse de se reproduire et qu'il détourne les réponses immunitaires en générant de multiples variants. Le système immunitaire tente de s'adapter aux nouveaux virus, mais au cours des années les variations incessantes du HIV-1 finissent par épuiser les défenses de l'organisme hôte. Il s'en suit alors une réplication incontrôlée du virus et la disparition complète des lymphocytes T CD4+.

Dès la primo-infection, une multiplication intense du virus a lieu : chaque jour, un individu infecté produit cent millions à un milliard de virus, tandis que plusieurs centaines de millions de lymphocytes T auxiliaires sont détruits et remplacés. Cette phase est pour la moitié des cas asymptomatique, et dans le cas où des symptômes apparaissent, ceux-ci ressemblent à ceux observés lors d'affections virales aiguës et passent souvent inaperçus.

Le système immunitaire réagissant à l'infection, le nombre de virus diminue progressivement dans le sang, mais il se réplique activement dans les tissus lymphoïdes : c'est la phase asymptomatique, qui peut être très longue (10 à 15 ans), et durant laquelle les lymphocytes T CD4⁺ vont lentement diminuer. On parle alors de séropositivité, mais pas encore de SIDA.

La dernière phase est la phase clinique, qui correspond au SIDA proprement dit, et qui apparaît lorsque le nombre de lymphocytes T CD4⁺ devient inférieur à 200/mm³. Les

manifestations les plus fréquentes sont les infections opportunistes, infections graves provoquées par un micro-organisme habituellement non pathogène, mais qui profite de l'opportunité de l'immunodéficience pour entraîner des pathologies sévères. Les principaux micro-organismes opportunistes sont des bactéries (*Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*), des protozoaires (*Leishmania*, Toxoplasme, *Microsporidium*...), des champignons (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*..), et des virus (Herpès Simplex, Epstein-Barr, Cytomégalovirus). L'immunodépression est également responsable de l'apparition de cancers, comme le sarcome de Kaposi et des lymphomes.

Dans la majorité des cas, les signes cliniques de déficit immunitaire apparaissent pendant les dix années suivant la séroconversion. Néanmoins, 5 à 10% des sujets demeurent cliniquement sains et immunologiquement normaux au-delà d'une décennie : ce sont des sujets dits « non-progresseurs à long terme », et dont la charge virale plasmatique est basse voire indétectable sans traitement antirétroviral, mais elle persiste (Rosenberg et al., 1997). Ces individus montrent des réponses vigoureuses et persistantes par les lymphocytes T CD4⁺, associées avec le contrôle de la charge virale. De nombreux travaux s'intéressent à ces sujets, afin de mieux comprendre les facteurs à l'origine de cette non-progression, qui pourraient servir au traitement de la maladie.

Par ailleurs, on a remarqué que dans des groupes de sujets à haut risque, comme les hémophiles ayant été transfusé avec du sang contaminé ou des homosexuels dont les partenaires étaient morts du SIDA, certains sujets n'étaient cliniquement pas atteints du SIDA. Ces sujets sont homozygotes pour une mutation dans le gène codant pour le corécepteur CCR5 : la protéine a perdu son domaine transmembranaire, elle est donc absente de la membrane des cellules immunitaires et ne peut pas jouer son rôle de corécepteur pour l'entrée du HIV-1. Cette anomalie serait rencontrée chez moins de 1% de la population (Liu et al., 1996).

1.4. Morphologie du virion

Les particules virales du HIV-1 ont une forme sphérique d'un diamètre d'environ 120 à 160 nm. Elles sont protégées par une enveloppe, constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des spicules d'origine virale, formées de l'association entre la protéine

de surface gp120 et la protéine transmembranaire gp41. Ces deux glycoprotéines sont indispensables à l'entrée du virus dans les cellules cibles, puisqu'elles participent à la fixation puis à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le corps viral (*core*) est composé de deux molécules d'ARN étroitement associées à des protéines de nucléocapside (NC), qui les réunissent et les protègent de l'activité des enzymes cellulaires. Ce corps renferme également les enzymes virales (transcriptase inverse RT, intégrase IN, et protéase PR), l'ensemble étant entouré par des protéines de capside (CA). Les protéines de matrice (MA) tapissent la face interne de l'enveloppe, contribuant ainsi à la structuration de la particule virale (**Figure 2**).

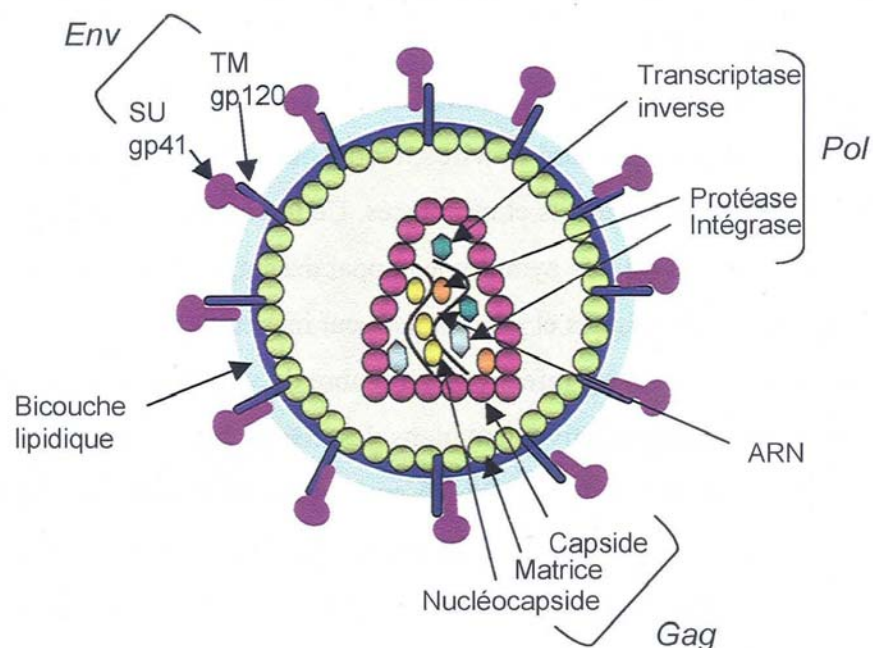


Figure 2 : Représentation schématique de la particule virale du HIV-1.

Le génome viral, constitué de deux molécules d'ARN, est associé aux protéines de nucléocapside et accompagné des enzymes virales (protéase, intégrase, transcriptase inverse). Ce complexe nucléoprotéique est entouré par les protéines de capside et de matrice, cette dernière tapissant toute la face interne de la particule virale. Les glycoprotéines gp41 et gp 120 forment des spicules insérées dans la bicouche lipidique d'origine cellulaire, pour constituer la membrane du virus.

I.5. Cycle viral

Le cycle viral du HIV-1 suit celui des autres rétrovirus, et se distingue en deux phases : une phase précoce et une phase tardive (**Figure 3**).

I.5.1.Phase précoce : du virus (ARN) au provirus (ADN)

La première étape du cycle viral est la **fixation** du virus sur la cellule cible, par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et le récepteur CD4 présent sur la surface cellulaire. Ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des cellules dendritiques dans les ganglions, la rate et l'épiderme, ou encore des cellules microgliales du cerveau.

Ce contact n'est pas suffisant pour induire la pénétration du virus dans la cellule. Deux corécepteurs jouent également un rôle *in vivo* : le récepteur aux α -chimiokines CXCR4 et le récepteur aux β -chimiokines CCR5. Le complexe trimérique gp120-CD4-corécepteur induit un changement conformationnel de la glycoprotéine gp41 qui va pouvoir exercer son activité fusionnante. Il y a alors fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, provoquant la pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule (Clapham and McKnight, 2002). Une fois dans le cytoplasme, la capsid se désagrège afin de libérer le génome viral, qui est converti en un « complexe de transcription inverse » (RTC) et sera rétrotranscrit.

L'étape de **transcription inverse** est une caractéristique des Rétrovirus qui a lieu majoritairement dans le cytoplasme de la cellule hôte, mais qui est initiée dans la particule virale (Lori et al., 1992). Elle s'effectue grâce à une enzyme particulière du virus, la transcriptase inverse ou RT (*Reverse Transcriptase*), et entraîne la formation d'un ADN bicaténaire, réplique des deux molécules d'ARN génomique viral. Les séquences ADN qui en résultent ne sont souvent pas rigoureusement identiques à la séquence virale initiale, d'où l'émergence de virus hétérogènes. En effet, la transcriptase inverse a une faible affinité pour l'ARN, ce qui entraîne des sauts d'un brin d'ARN viral à l'autre. Il en résulte un ADN proviral recombinant, contenant des séquences dérivant de chacun des deux ARN parentaux (Negroni and Buc, 2001). Par ailleurs, la RT est une enzyme peu fidèle, ce qui provoque régulièrement des mutations dans l'ADN néosynthétisé (3.10^{-5} mutation par cycle de réplication).

L'**import nucléaire** de l'ADN proviral fait intervenir un ensemble de protéines pour constituer un complexe de préintégration ou PIC. Ce complexe spécifique contient notamment les protéines virales MA, IN, NC et Vpr, mais sa composition exacte n'est pas encore définie (Adachi et al., 1999). Celui-ci est capable de traverser la membrane nucléaire pour permettre à l'ADN proviral d'accéder aux chromosomes de la cellule hôte, où il s'intègre de manière aléatoire sous forme d'un provirus.

L'étape d'**intégration** est assurée par l'intégrase virale, qui induit le clivage à la fois des deux brins de l'ADN proviral et de l'ADN cellulaire, et permet l'insertion du provirus. Des enzymes cellulaires achèvent la réparation de la séquence joignant les deux ADN, et le provirus intégré se comporte comme n'importe quel gène cellulaire (Van Maele and Debysers, 2005).

1.5.2. Phase tardive : du provirus aux nouveaux virions

L'expression des gènes du virus dépend à la fois de l'activité de protéines virales régulatrices et de la coopération de facteurs cellulaires. En particulier, la protéine régulatrice Tat intervient rapidement afin d'orienter l'ARN polymérase II cellulaire vers la transcription des gènes viraux. Par ailleurs, l'expression de la protéine Rev va permettre la synthèse des protéines de structure et des enzymes du virus. Ainsi, l'expression des protéines virales régulatrices provoque la transition de la phase précoce à la phase tardive, où sont produites les protéines permettant la génération de particules virales complètes.

La **transcription** du provirus est amorcée par des facteurs de transcription cellulaires, puis elle s'amplifie sous l'action de la protéine virale Tat. Cette protéine régulatrice est un trans-activateur puissant de la transcription qui intervient au niveau de la séquence LTR (*Long Terminal Repeat*) du génome viral. Les ARN messagers viraux (ARNm) ainsi formés sont alors maturés par épissage, conduisant à différents types d'ARNm. Les ARN multi-épissés (1.7 à 2 kb) codent pour les protéines régulatrices Tat, Nef et Rev. Cette dernière intervient pour l'export vers le cytoplasme des deux autres types d'ARNm, les ARN partiellement épissés (environ 4 kb) codant pour les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr, et les ARN non épissés (environ 9,2 kb) codant pour les précurseurs protéiques Gag, Pol et Pro. Ce dernier type d'ARN sert également d'ARN génomique viral, qui sera encapsidé dans les nouveaux virions (Pollard and Malim, 1998).

La **synthèse des protéines virales** a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte. Certains ARNm sont re-transloqués dans des compartiments cytoplasmiques spécifiques pour y être traduits en protéines, comme le gène *env* qui est traduit au niveau du réticulum endoplasmique.

L'**assemblage** des particules virales est dirigé par la polyprotéine Gag. Il est en effet initié par la multimérisation de cette protéine, ce qui conduit à la condensation des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol et à la liaison de Gag avec l'ARN génomique (Zhang et al., 1996). L'ARN dimère ainsi recouvert va être dirigé vers les membranes cellulaires grâce au domaine MA de Gag, qui a une bonne affinité pour les membranes comme la membrane plasmique ou celle de certains endosomes (Gonzalez et al., 1993). Des interactions entre le domaine MA et la protéine transmembranaire gp41 entraînent l'association des autres protéines virales pour recouvrir l'ARN génomique et former des particules virales (Dorfman et al., 1994).

L'étape de **bourgeonnement** permet la structuration des particules virales au niveau de la membrane et leur **libération**. Ce processus implique une restructuration locale du cytosquelette (Demirov and Freed, 2004), et fait intervenir le peptide p6 de Gag ainsi que l'ubiquitine, protéine cellulaire qui intervient comme signal pour les mouvements des protéines dans les différentes vésicules membranaires (Ott et al., 1998).

Il est en général considéré que l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales a lieu à la membrane plasmique des cellules infectées. Cependant, des études récentes montrent que dans certains types cellulaires, les particules virales peuvent s'assembler au niveau de la membrane des endosomes tardifs, pour être libérés par exocytose (Muriaux et al., 2004). Il a ainsi été montré que dans des cellules épithéliales humaines, le HIV-1 utilise la voie de l'endocytose/exocytose pour la libération de ses nouveaux virions (Grigorov et al., 2006).

Les particules virales ainsi libérées sont immatures. La **maturation** des différents précurseurs intervient pendant l'assemblage et après bourgeonnement, sous l'action de la protéase virale qui clive les précurseurs Gag, Gag-Pro-Pol et Env, et conduit à la formation de virus matures infectieux ou virions (Henderson et al., 1990).

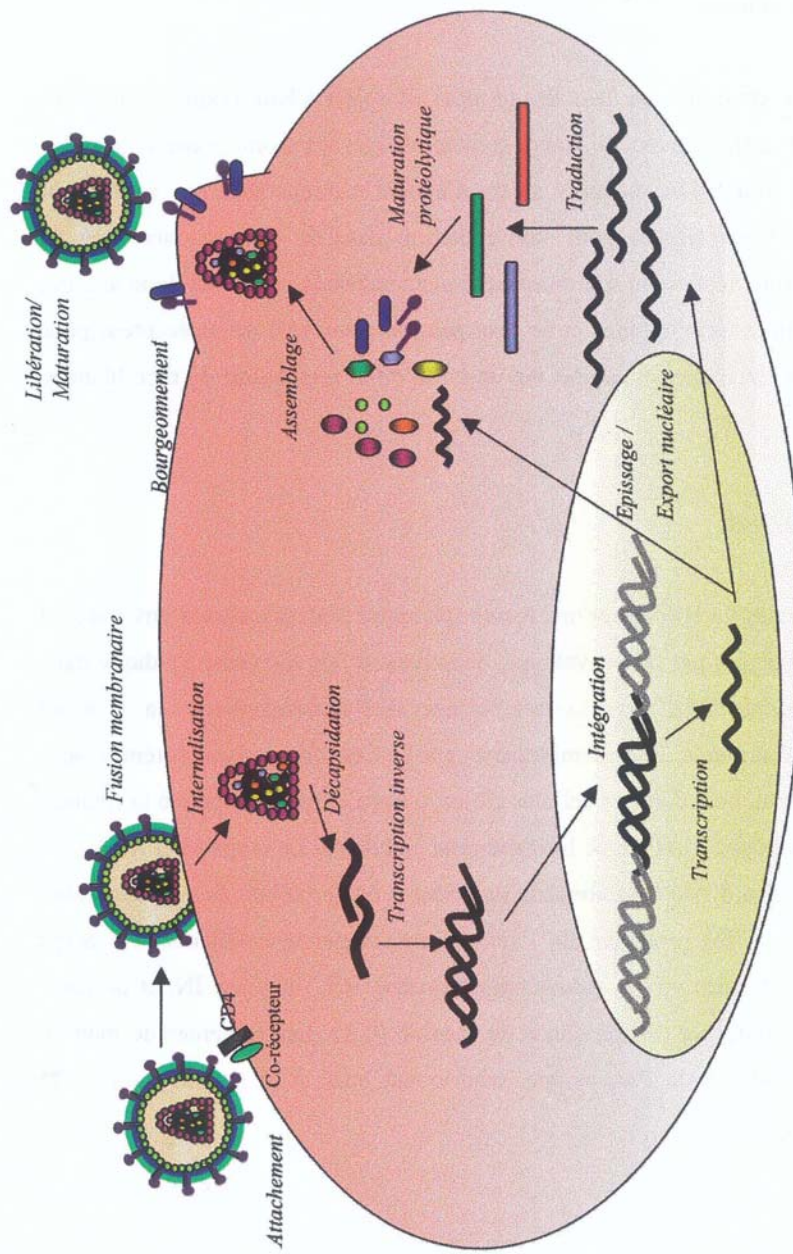


Figure 3 : Le cycle viral du HIV-1.

Après liaison au récepteur/co-récepteur présent à la surface de la cellule, la particule virale fusionne avec la membrane cellulaire et pénètre dans le cytoplasme. La capsid se désintègre pour libérer l'ARN génomique viral, qui sera rétrotranscrit en ADN double brin. Ce dernier migre dans le noyau où il s'intègre dans le génome cellulaire sous forme de provirus. L'ADN proviral pourra être transcrit grâce à la machinerie cellulaire puis épissé et traduit en protéines après export dans le cytoplasme. Certains ARNm viraux ne sont pas ou partiellement épissés ; ils sortent du noyau sous le contrôle de la protéine virale Rev et pourront être traduits en précurseurs protéiques. Ces derniers sont clivés pour produire les protéines constituant le virus. L'ARN génomique complet sort du noyau de la même manière, et sera assemblé avec les protéines virales pour former de nouvelles particules qui pourront être libérées par bourgeoisement.

I.6. Le génome viral

I.6.1. Organisation du génome

Le génome des lentivirus est constitué de deux brins d'ARN (+) identiques et associés en dimère. Bien que de polarité positive, ces ARN ne sont pas utilisés directement comme ARN messagers, mais ils sont rétrotranscrits en ADN double brin qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte (**Figure 4**).

Le génome du HIV-1, d'une taille d'environ 9,2 kb, permet l'expression de neuf gènes codant pour les protéines de structure (*gag*), les protéines d'enveloppe (*env*), les enzymes (*pro-pol*), ainsi que pour les gènes de régulation *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*. Ces séquences géniques sont bordées à leurs deux extrémités par de longues régions non codantes essentielles pour le cycle viral.

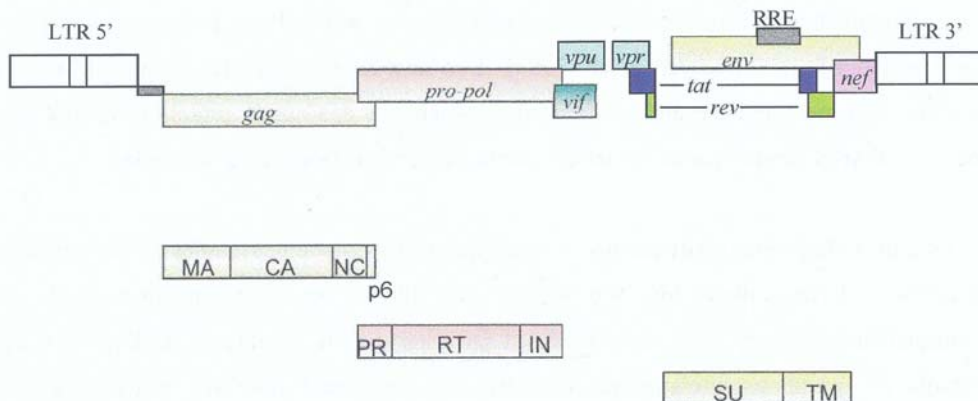


Figure 4 : Organisation du génome viral

L'ADN proviral contient trois phases principales de lecture : *gag*, *pro-pol* et *env*, codant pour les protéines de structure (MA, CA, NC, p6, SU, TM) et les enzymes virales (PR, RT, IN). Il possède également 6 gènes codant pour les protéines régulatrices : *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*, *tat* et *rev*. Il est entouré de deux longues régions non codantes (LTR) identiques.

Les régions non codantes sont les régions stratégiques du virus. On y trouve de nombreux signaux de régulation de la transcription et de la traduction, des séquences d'amorçage de la réplication, ainsi que des signaux pour l'intégration et l'encapsidation.

Parmi ceux-ci se trouvent deux longues régions terminales non codantes, les LTR (*Long Terminal Repeat*), situées de part et d'autre de la séquence provirale. Ce sont des éléments ADN constitués de trois régions principales : U3, R et U5. Chacune de ces trois régions, bien qu'identiques en séquences entre les deux LTR 5' et 3', ont des fonctions variables. En effet, le LTR 5' est un promoteur puissant de la transcription, possédant des sites de liaison aux facteurs de transcription Sp1 et NF-κB. Par ailleurs, une séquence ARN issue de la transcription basale à partir de ce promoteur est reconnue par Tat, la séquence TAR, ce qui va stimuler la transcription virale. Cet élément TAR est également important pour les étapes de traduction et d'encapsidation. En 3', le LTR contient notamment le signal de polyadénylation essentiel à la maturation des ARNm. C'est également un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire situé à proximité.

En aval de la région 5' UTR de l'ARN génomique se trouvent le PBS (*Primer Binding Site*) qui est nécessaire à la transcription inverse, la région de dimérisation DIS (*Dimerisation Initiation Site*) qui forme le dimère d'ARN génomique par interaction avec la séquence DIS d'un autre ARN, ainsi que le site donneur d'épissage SD (*Donor Site*), servant à la maturation des ARNm.

Au sein du gène *env* se situe un élément de réponse à la protéine régulatrice Rev, le RRE (*Rev Responsive Element*). Ce RRE forme une structure secondaire qui interagit directement avec Rev, permettant l'export des ARNm viraux non ou partiellement épissés (contenant le RRE) vers le cytoplasme.

1.6.2. Les protéines virales

Les différentes protéines virales sont synthétisées au cours du cycle viral selon un schéma bien défini, régulé à la fois par des facteurs cellulaires et certaines protéines régulatrices du virus. Les enzymes et les protéines de structure participent à la formation des nouvelles particules virales, tandis que les protéines régulatrices interviennent dans la pathogenèse et le contrôle des réponses de l'organisme hôte (Cullen, 1998 ; Li et al., 2005)

Les premiers événements de traduction interviennent à partir des ARN multi-épissés présents dans le cytoplasme, pour produire les protéines régulatrices Tat et Rev. Les processus de transcription sont alors fortement stimulés sous l'action de Tat, et la présence de Rev permet l'apparition dans le cytoplasme d'ARN messagers viraux mono-épissés et non-épissés, qui

seront traduits en protéines accessoires (Vif, Nef, Vpr et Vpu) et en protéines de structure et enzymes (Gag, Pol, Env).

Tat (*Trans-activator of Transcription*) est un activateur puissant de la transcription du provirus en ARNm et en ARN génomique. Cette protéine nucléaire participe au remodelage de la chromatine au niveau du site d'intégration du provirus, le rendant plus « conforme » pour la transcription. En effet, Tat se fixe sur une séquence structurée située dans la région 5' UTR de l'ARN génomique, l'élément TAR (*Transactivation-responsive Region*), et recrute un ensemble de facteurs de transcription cellulaires (Zhou and Sharp, 1995). Tat est également capable d'activer le facteur de transcription NF- κ B, qui se lie sur l'élément enhancer du LTR ou sur des gènes cellulaires pour stimuler la transcription (Marcello et al., 2001).

Outre ce rôle crucial dans l'activation de la transcription virale, Tat est associée à de nombreuses activités. En particulier, Tat est un modulateur important des réponses inflammatoires liées à l'infection par le HIV-1. En effet, Tat possède la capacité de rentrer dans les cellules grâce à une région de sa séquence riche en résidus basiques appelée PTD (*Protein Transduction Domain*), et peut affecter les différentes voies de signalisation cellulaires. Par cette action, Tat est pour partie responsable de la destruction massive des lymphocytes T et des cellules endothéliales du cerveau, ainsi que du développement de tumeurs, à l'origine des désordres immunitaires et neurologiques associés au syndrome du SIDA (Yang et al., 2003 ; Lee et al., 2005).

Rev (*Regulator of Expression of Viral proteins*) est une protéine essentielle à la réplication virale, puisqu'elle permet la traduction des protéines de structure et des enzymes virales, et l'accumulation de molécules d'ARN génomique complet qui seront encapsidées dans les nouveaux virions (Terwilliger et al., 1988). En effet, Rev reconnaît spécifiquement un élément présent sur tous les ARNm viraux non complètement épissés, le RRE (*Rev-Responsive Element*), et utilise les systèmes de transport cellulaires pour les exporter vers le cytoplasme (Malim et al., 1989a).

Je développerai les fonctions et modes d'action de ces deux protéines régulatrices dans un prochain chapitre, puisque Rev constitue le sujet principal de mon travail de thèse, et que certaines propriétés fondamentales de Tat pour la réplication virale ont été exploitées pour mes travaux.

Nef est un facteur aux effets multiples sur la réplication virale. Il a d'abord été montré que Nef avait un effet répresseur sur la transcription d'où le nom de *Negative regulatory Factor* (Cheng-Mayer et al., 1989). Cependant, d'autres auteurs ont rapidement démontré un rôle important de Nef à différentes étapes du cycle viral, ainsi qu'un rôle positif sur la pathogénèse virale. En effet, Nef module l'expression de récepteurs à la surface des cellules infectées, et en particulier le récepteur CD4 et les molécules du CMH de classe I (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*), essentiels à la réponse immunitaire. En effet, Nef interagit avec les protéines adaptatrices AP-1 et AP-2 (*Adaptator Complex*), qui sont impliqués dans l'endocytose et la dégradation de récepteurs présents à la surface cellulaire, dont CD4 (Janvier et al., 2003). Cette régulation affecte l'efficacité de la réponse immunitaire, et accélère la multiplication du virus. Par ailleurs, Nef stimule l'infectivité du virion, en induisant un remodelage du cytosquelette d'actine (Campbell et al., 2004), et altère la production de certaines chimiokines pour répandre l'infection (Schmidtmayerova et al., 1996 ; Wang et al., 2000). Elle est également impliquée dans la résistance des cellules infectées contre l'apoptose médiée par Tat, et régule le transport du cholestérol dans les cellules infectées en le recrutant pour l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales (Zheng et al., 2003a).

Vif (*Virion Infectivity Factor*) est fortement exprimée lors de la phase tardive du cycle viral. Elle est essentielle pour la production de virions dans certains types cellulaires dits « restrictifs », comme les lymphocytes primaires et les macrophages, alors que des virus *Δvif* se répliquent efficacement dans des cellules dites « permissives » (Cullen, 1998). La fonction exacte de Vif dans l'infection des cellules « restrictives » est longtemps restée inconnue, mais on sait maintenant que Vif cible certains facteurs cellulaires dits « de restriction », qui inhibent la réplication du virus. En particulier, Vif bloque l'action antivirale de APOBEC3G, une protéine de la famille des cytidine désaminases qui s'incorpore aux particules virales et induit des mutations dans le génome viral, délétères pour la multiplication du virus (Santa-Marta et al., 2005). Vif intervient également dans la transcription inverse en stimulant l'activité de la RT (Cancio et al., 2004).

Vpu (*Viral Protein u*) est une petite protéine membranaire qui stimule la libération des nouveaux virions et induit la dégradation de CD4. En effet, il a été montré que Vpu inhibe l'activité de TASK-1, une protéine formant des canaux potassium qui seraient impliquées dans la rétention des particules virales au niveau des membranes cellulaires (Hsu et al., 2004). Par ailleurs, Vpu interagit avec le domaine cytoplasmique de CD4 et plusieurs

membres de la machinerie d'ubiquitylation, provoquant l'ubiquitylation de CD4 et sa dégradation, probablement par le protéasome (Margottin et al., 1998).

Vpr (*Viral Protein r*) est retrouvée à la fois dans les virions, dans les cellules, et dans le sérum et le liquide céphalorachidien des patients infectés, suggérant une action vaste sur de nombreuses cibles. En effet, Vpr participe à l'import du complexe de pré-intégration dans le noyau, probablement en stabilisant l'interaction entre des facteurs de l'import nucléaire et la protéine virale MA (Adachi, 1999). D'autre part, elle interfère avec la progression du cycle cellulaire, en induisant l'arrêt rapide des cellules en phase G2/M. Cette interruption du cycle permet d'augmenter la réplication virale, notamment en stimulant l'activité du LTR (Bukrinsky and Adzhubei, 1999). Par ailleurs, Vpr possède une séquence d'export nucléaire (*Nuclear Export Sequence, NES*), qui lui permettrait d'être incorporée dans les nouveaux virions (Sherman et al., 2003).

Les protéines Gag, Pol et Env sont les protéines majoritaires du virus. Elles sont exprimées à partir des ARN non ou partiellement épissés et sont traduites sous formes de précurseurs polyprotéiques. Leur clivage par la protéase virale ou par des protéases cellulaires génère les différentes protéines de structure du virus et les enzymes virales (**Figure 5**).

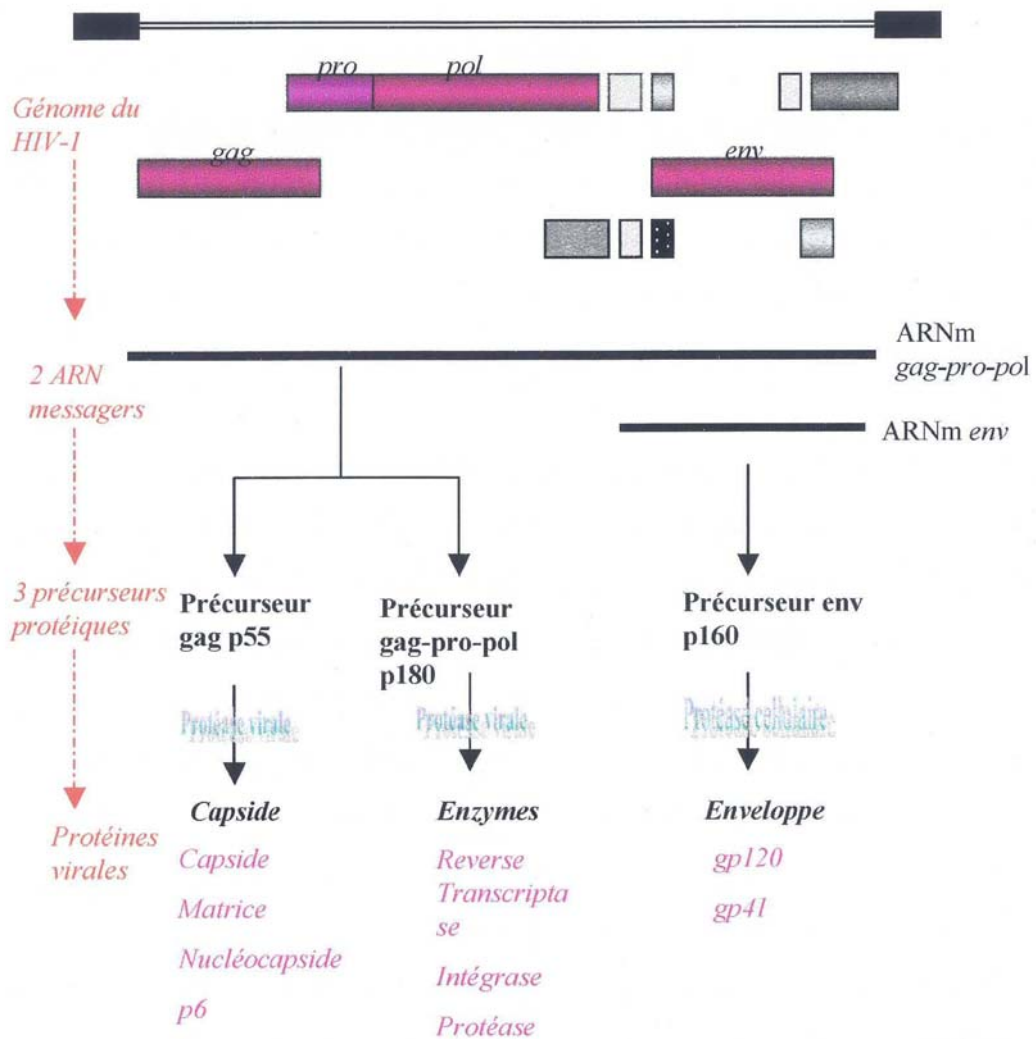


Figure 5 : Synthèse des protéines de structure et des enzymes du HIV-1.

Le génome du HIV-1 comporte trois gènes principaux : *gag*, *pro-pol* et *env*. Ceux-ci sont transcrits en deux ARN messagers différents qui conduisent à la synthèse de trois précurseurs protéiques : gag p55, gag-pro-pol p180 et env p160. Ces précurseurs sont clivés par les protéases virale ou cellulaire, pour aboutir aux différentes protéines de structure et aux enzymes virales. Pour simplification, les 6 gènes de régulation du HIV-1 sont volontairement omis dans cette figure.

La traduction de l'ARN non épissé (ARN génomique) produit deux polyprotéines : le précurseur Gag p55 et le précurseur Gag-Pro-Pol p180, où le gène Gag est incomplet et est formé suite à un saut de phase de lecture d'un nucléotide en amont (-1). Ce saut de phase a lieu approximativement une fois sur 20, d'où l'abondance du précurseur Gag en large excès par rapport à Gag-Pro-Pol.

La protéase virale est synthétisée en fusion avec la polyprotéine Gag, et libérée sous sa forme mature par autoclivage. Elle est responsable de la maturation virale en clivant les précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol.

La maturation du précurseur Gag (*internal group specific antigen*) conduit à la libération des protéines de matrice (MA, p16), de capsid (CA, p24), de nucléocapsid (NC, p7), et du peptide p6.

La **protéine MA**, qui tapisse la face interne du virus mature, joue un rôle dans le guidage du précurseur Gag vers la membrane plasmique, où s'effectue sa maturation par la protéase virale (Gottlinger et al., 1989). En effet, MA est myristoylée dans la cellule, groupement myristate qui est nécessaire à l'ancrage de Gag à la membrane cellulaire. Cet ancrage initie le processus d'assemblage du virus, qui implique entre autres l'association des protéines Gag et le recrutement de la protéine gp41 à la membrane (Dorfman et al., 1994). Elle semble également contribuer à l'import du PIC dans le noyau, puisqu'elle possède des signaux de localisation nucléaire (*Nuclear Localisation Signal, NLS*) et qu'elle s'associe avec certains facteurs cellulaires de l'import (Adachi et al., 1999).

La **protéine CA** s'assemble sous forme d'hexamères associés en une structure serrée qui protège le génome ARN au cœur de la particule virale. La région CA dans le précurseur Gag est également impliquée dans la multimérisation des protéines Gag (Zhang et al., 1996). Dans les cellules dites « restrictives » à l'infection, le pool de CA serait activement dégradé, sous l'action d'une protéine de la famille TRIM, TRIM5 α (*Tripartite Motif*). Cette protéine forme en effet des trimères, qui semblent s'insérer parfaitement dans la structure de la capsid et pourraient entraîner sa désintégration (Li et al., 2000).

La **protéine NC**, associée à l'ARN, joue le rôle de chaperonne, assistant ainsi les étapes de transcription inverse, d'intégration et d'assemblage (Berthoux et al., 1997 ; Bampi et al., 2004).

Le **peptide p6** participe à l'assemblage et au bourgeonnement des nouvelles particules virales pour leur libération (Campbell and Rein, 1999). En effet, p6 intervient dans l'incorporation des protéines virales Nef et Vpr dans les virions (Costa et al., 2004 ; Paxton et al., 1993). Ce peptide fixe également l'ubiquitine, protéine impliquée dans la formation des vésicules pour le trafic intracellulaire.

La maturation du précurseur Gag-Pro-Pol conduit à la libération des enzymes du virus : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN).

Comme déjà mentionné, la **protéase** joue un rôle central dans la maturation du virus, mais elle est également capable de cliver des substrats cellulaires comme le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Strack et al., 1996) ou encore le facteur de transcription eIF-4GI (Ohlmann et al., 2002).

La **reverse transcriptase** assure l'étape de transcription inverse, qui permet la formation d'un ADN bicaténaire proviral en réplique du génome ARN initial, qui pourra être intégré au génome de la cellule infectée. Cette enzyme possède une double fonction : elle est à la fois ADN polymérase pour synthétiser les brins d'ADN à partir des amorces virales ARN, et Rnase H pour dégrader ces amorces. Elle interagit avec la protéine NC, ce qui favorise sa processivité (Lener et al., 1998).

L'**intégrase** permet l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, en se liant sur des sites spécifiques aux extrémités 5' et 3' du provirus, les sites *att* (Leavitt et al., 1992). Elle possède une séquence NLS impliquée dans l'import du PIC vers le noyau (Turelli et al., 2001). Cette étape d'intégration semble pouvoir se faire de manière plutôt aléatoire, mais l'intégrase est probablement dirigée vers des sites préférentiels sur l'ADN cellulaire, grâce à certains facteurs cellulaires comme le facteur de croissance LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*). En effet, des études récentes ont montré que ce facteur épithélial se fixe sur l'intégrase et affecte sa localisation et sa stabilité sur l'ADN, influençant alors le positionnement de l'enzyme sur l'ADN cellulaire pour l'intégration du provirus (Ciuffi et al., 2005).

La polyprotéine Env, produite à partir d'un ARNm mono-épissé, possède un peptide signal permettant sa fixation au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Elle subit ensuite une glycosylation dans l'appareil de Golgi pour donner la glycoprotéine précurseur gp160. Celle-ci sera alors clivée par des protéases cellulaires en SU gp120 (*Surface protein*) et TM gp41 (*Transmembrane protein*).

La protéine **SU gp120** est présente à la surface des particules virales, et interagit avec le récepteur de la cellule à infecter. Par cette fonction, SU gp120 est un déterminant du tropisme du virus, en « désignant » quelles cellules peuvent être infectées. En effet, l'infectabilité des cellules est déterminée par l'expression de récepteurs spécifiques à leur surface, par lesquels

le HIV-1 peut déclencher le processus d'infection. Ainsi, le HIV-1 infecte les cellules exprimant le récepteur CD4 et certains corécepteurs dont CCR5 et CXCR4 (Lasky et al., 1987). Un autre type de récepteur peut interagir avec gp120, la molécule DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Non-integrin*), une lectine fortement exprimée dans les cellules dendritiques immatures de l'épithélium muqueux. Ces cellules dendritiques sont d'excellentes cellules présentatrices d'antigènes (APC), et parmi les premières à « rencontrer » le virus lorsque celui-ci pénètre les muqueuses. Le récepteur DC-SIGN permet la capture du virus, puis sa présentation à la surface des cellules dendritiques matures, qui migrent vers les organes lymphoïdes. Le virus peut alors infecter efficacement le réservoir de lymphocytes, par des contacts entre cellules dendritiques et cellules T CD4⁺, entraînant sa dissémination rapide (Piguet and Blauvelt, 2002).

La protéine **TM gp41** est localisée au sein de la membrane grâce à sa nature hydrophobe. Elle interagit avec la protéine gp120 par sa partie extracellulaire, et permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire, essentielle à la rentrée du virus (Perez et al., 1992).

II. Régulation de l'activité des protéines par des modifications post-traductionnelles

L'action d'une protéine au sein de la cellule est intimement liée à sa concentration en protéines actives. En effet, il existe un équilibre intracellulaire dynamique entre la synthèse d'une protéine active et son inactivation. C'est pourquoi la plupart des protéines cellulaires subissent des modifications pendant ou au cours de leur synthèse, qui permettent de réguler très finement leur activité. Ces modifications post-traductionnelles peuvent être impliquées directement dans la modulation de l'activité des protéines, mais elles peuvent également intervenir pour l'adressage des protéines vers des compartiments cellulaires spécifiques, où elles pourront exercer leur fonction, être de nouveau modifiées ou encore être dégradées. Ces modifications peuvent aussi permettre la reconnaissance de la protéine par des facteurs métaboliques nécessaires à son activation ou l'envoyant vers les systèmes de dégradation.

Il existe de très nombreuses modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation des voies de signalisation cellulaires, et en particulier pour le contrôle de l'expression des gènes et la réponse aux signaux extracellulaires. La plupart d'entre elles consistent en une modification d'un résidu de la protéine, par ajout ou retrait d'un groupement spécifique qui va en changer les propriétés. Parmi les nombreux exemples peuvent être cités la phosphorylation et l'acétylation, qui sont très fréquentes, ou encore la méthylation, l'hydroxylation, ou la glycosylation. Les protéines peuvent être également modifiées par la fixation de polypeptides comme l'ubiquitine ou des protéines similaires comme SUMO (*Small ubiquitin related modifier*) (Varshavsky, 1997 ; Kerscher et al., 2006)

Une même protéine peut subir différentes modifications, à des temps donnés ou à plusieurs endroits de sa séquence, induisant un changement rapide et souvent réversible de sa fonction. Ainsi, l'ensemble des processus intracellulaires sont finement régulés par un réseau complexe de modifications, qui jouent le rôle d'interrupteurs pour activer ou désactiver les différents acteurs des voies de signalisation.

Je détaillerai plus précisément les cas d'ubiquitylation et de sumoylation, puisque ces deux modifications ont fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse. Les paragraphes suivants décriront comment l'ubiquitine et les protéines SUMO peuvent modifier un substrat et quels

en sont les effets sur l'activité de ce substrat. Par ailleurs, je montrerai comment un défaut de fonctionnement de ces systèmes de régulation peut avoir des conséquences dramatiques sur le fonctionnement de la cellule, pour aboutir parfois à des pathologies sévères. Enfin, on sait maintenant que certains virus utilisent les protéines ubiquitine et SUMO pour détourner le fonctionnement de la cellule et favoriser leur multiplication. Je citerai donc quelques exemples pertinents, et tout particulièrement à propos des protéines du HIV-1.

II.1. L'ubiquitine, un signal aux multiples facettes

L'ubiquitylation apparaît à l'heure actuelle comme une des plus importantes voies de régulation des protéines, impliquée non seulement dans les processus de dégradation protéique, mais également dans l'adressage des protéines vers différents compartiments cellulaires ou encore dans la modulation de leur activité. Cette modification joue particulièrement un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire et de certains aspects de la différenciation et du développement, dans la surveillance du génome, dans la modulation des réponses au stress ou à des facteurs extracellulaires, ou encore dans la régulation des réponses immunitaire et inflammatoire.

II.1.1. Synthèse et activation

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, isolée en 1975 à partir de thymus bovin, et rapidement décrite comme une protéine abondante, ubiquitaire et très conservée chez les organismes eucaryotes (Schlesinger et al., 1975). Quelques années plus tard, des auteurs l'identifient comme un composant essentiel du système de dégradation protéolytique cellulaire dépendant de l'ATP, et la dénomment APF-1 (*ATP-dependent proteolysis factor 1*). Ils découvrent également que l'ubiquitine (ou APF-1) modifie son substrat par une liaison covalente et identifient les différentes enzymes nécessaires à la réaction d'ubiquitylation E1, E2 et E3 (Hershko et al., 1996). En 1987, une autre fonction de l'ubiquitine est identifiée, non protéolytique, mais en tant que chaperonne de protéines ribosomiques naissantes, pour permettre leur association en ribosomes (Finley et al., 1989). Depuis, d'innombrables études sont menées pour décrypter chaque détail de l'organisation moléculaire et du fonctionnement du système ubiquitine.

La réaction d'ubiquitylation aboutit à la fixation d'un monomère d'ubiquitine sur une molécule substrat, par le biais d'une liaison covalente entre un résidu lysine du substrat et le résidu Glycine carboxy-terminal de l'ubiquitine (**Figure 6**). Cette réaction implique plusieurs enzymes spécifiques de l'ubiquitine, dans une cascade d'activations dépendantes de l'ATP (Ciechanover et al., 2000). Initialement, l'ubiquitine est activée par l'enzyme d'activation de l'ubiquitine E1 (*ubiquitin-activating enzyme*), qui établit une liaison avec le résidu glycine 76 en position carboxy-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*), puis sur un résidu lysine de la molécule substrat. Cette dernière étape peut s'effectuer via l'enzyme E2 ou nécessiter une troisième catégorie d'enzymes, les ubiquitine ligases E3, qui sélectionnent leur substrat de manière très spécifique. En effet, il existe plus de 500 E3 différentes chez les mammifères, qui reconnaissent chacune des substrats ainsi que des enzymes E2 spécifiques. A l'inverse, une seule enzyme E1 est connue chez la Levure et chez les mammifères, et on dénombre une quantité limitée d'enzymes E2 (Wong et al., 2003). Ainsi, l'ubiquitylation est un processus très spécifique, mais qui concerne un très grand nombre de protéines dans la cellule. Cette diversité de substrats, corrélée à une très haute spécificité d'action, explique les nombreuses fonctions physiologiques de l'ubiquitine.

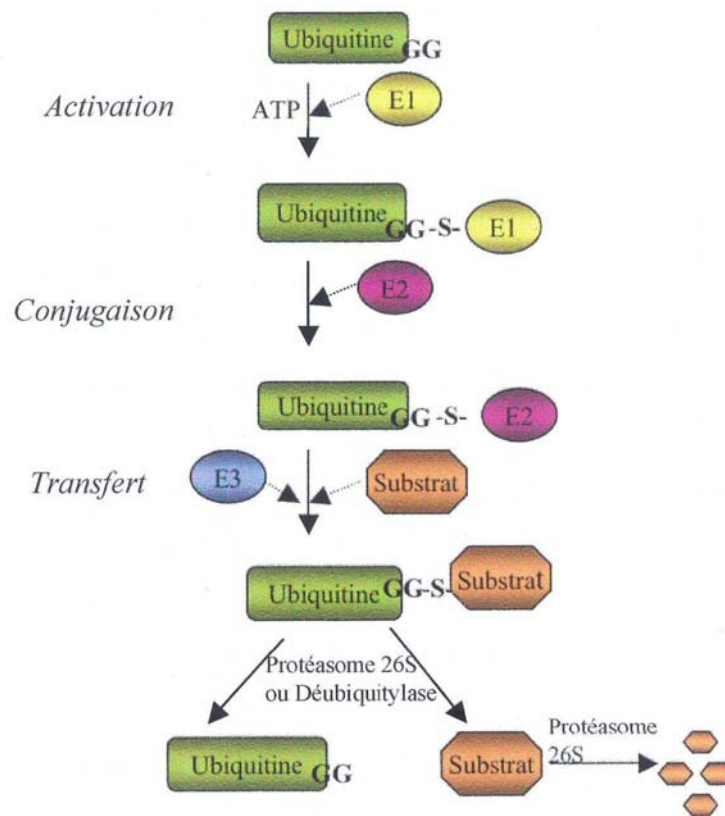


Figure 6 : Cycle de conjugaison de l'ubiquitine.

La réaction d'ubiquitylation s'effectue en trois étapes. L'ubiquitine est activée par une enzyme E1, qui établit une liaison thioester avec le résidu glycine carboxy-terminal de l'ubiquitine. Celle-ci est ensuite transférée par transacylation sur une enzyme E2, puis sur une ligase E3 sur laquelle est accroché le substrat. Cette dernière permet la liaison de l'ubiquitine sur son substrat. Le substrat ainsi modifié peut alors être reconnu par le protéasome 26S pour être dégradé et libérer l'ubiquitine, ou intervenir dans d'autres fonctions cellulaires. Des protéases spécifiques de l'ubiquitine (déubiquitylases) recyclent l'ubiquitine en clivant les monomères d'ubiquitine fixés sur le substrat.

Après la fixation du premier monomère d'ubiquitine, d'autres monomères peuvent se lier via des résidus lysine libres sur le substrat, qui sera alors poly-monoubiquitylé. Alternativement, des liaisons peuvent s'établir entre plusieurs monomères d'ubiquitine, via la Glycine 76 de l'un et un résidu Lysine de l'autre, pour former une chaîne de polyubiquitine fixée sur le substrat. En effet, l'ubiquitine possède 7 résidus lysine en positions 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63, tous potentiellement capables d'établir une liaison covalente avec un substrat, bien que les cas de polyubiquitylation via les lysines 48 et 63 soient les plus documentés (Haglund and Dikic, 2005). Ainsi, monoubiquitylation, poly-monoubiquitylation et polyubiquitylation représentent de multiples possibilités de modifications des protéines, qui permettent une modulation fine et spécifique de leur activité dans la cellule (**Figure 7**).

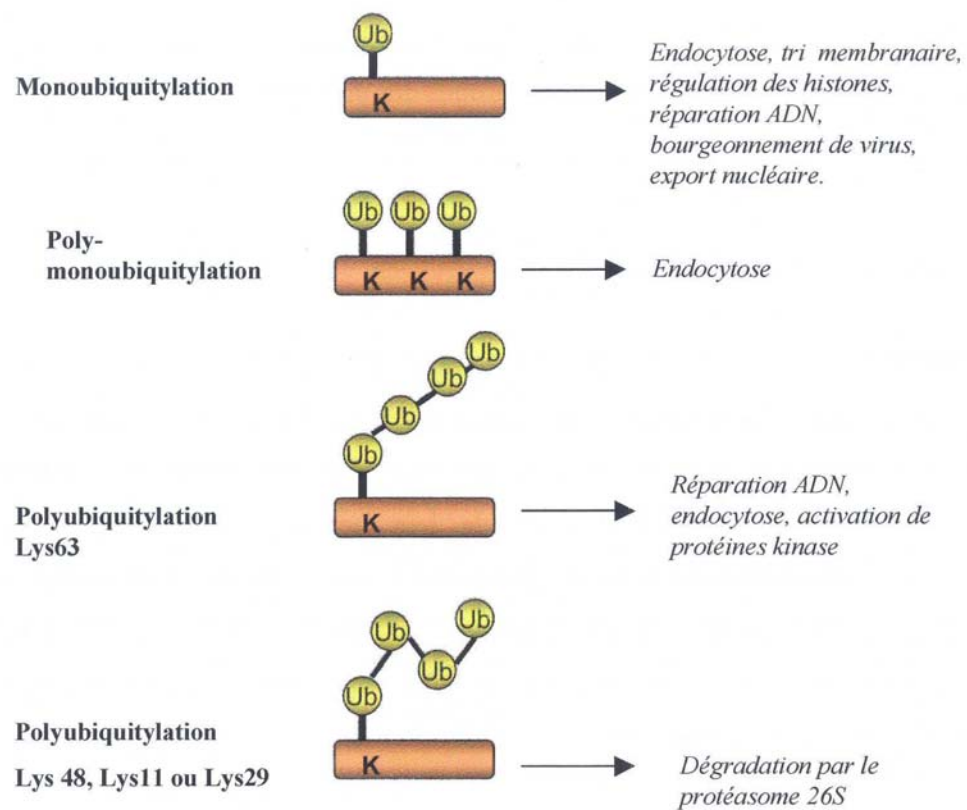


Figure 7 : Types de conjugaison de l'ubiquitine et rôle sur les substrats.

L'ubiquitine comprend 7 lysines (K) toutes potentiellement capables de former des chaînes sur un substrat. Les conséquences de cette conjugaison sont différentes, selon le nombre de résidus lysine modifiés sur le substrat et selon le nombre de monomères d'ubiquitine fixés sur le substrat. En particulier, la monoubiquitylation permet l'endocytose de protéines membranaire ou le bourgeonnement de virus. La formation de chaînes d'ubiquitine sur une seule lysine du substrat a des conséquences différentes selon la lysine de l'ubiquitine impliquée, qui induit une conformation particulière de la chaîne de polyubiquitine. Ainsi, les chaînes liées par K63 n'induisent pas la dégradation du substrat, mais régulent la fonction et/ou la localisation de celui-ci. Les chaînes faisant intervenir les lysines 11, 29 et 48 conduisent à la protéolyse du substrat par le système du protéasome 26S. Les fonctions des lysines 7 et 33 de l'ubiquitine restent encore obscures.

II.1.2. Rôles de l'ubiquitylation

a) L'ubiquitine et la dégradation

L'ubiquitylation a un rôle important en tant que signal de dégradation. En effet, l'ubiquitine a été initialement corrélée au système de dégradation protéique de la cellule, processus

notamment impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Hershko et al., 1996). Les chaînes d'ubiquitine d'au moins quatre monomères liées par la lysine 48 sont le principal signal pour la dégradation par le protéasome 26S (Thrower et al., 2000). Les chaînes via les lysines 11 ou 29 servent également probablement d'étiquettes pour envoyer les protéines vers la dégradation (Pickart and Fushman, 2003).

Le protéasome 26S est présent à la fois dans le cytoplasme, sous les membranes cellulaires et dans le noyau (Wojcik and DeMartino, 2003). Il est constitué d'une soixantaine de protéines formant trois sous-complexes : le corps 20S, responsable de l'activité de protéolyse, et deux coiffes régulatrices 19S bordant le corps 20S à chacune de ses extrémités (**Figure 8**). Le corps 20S est un cylindre creux constitué de quatre anneaux composés de sept sous-unités α ou β . Les anneaux β portent les trois activités protéolytiques principales, β 1 permettant le clivage après les résidus acides (activité PGPH, *post-glutamyl peptide hydrolysis*), β 2 induisant le clivage après les résidus basiques (activité trypsine), et β 5 reconnaissant les résidus hydrophobes (activité chymotrypsine). Les coiffes 19S sont constituées de protéines chaperonnes et d'enzymes ATPases qui contrôlent l'entrée des substrats à dégrader, en permettant le déroulement de leur structure tridimensionnelle pour le passage à travers le corps 20S. Elles sont également impliquées dans le clivage des chaînes de polyubiquitine (Wenzel and Baumeister, 1995).

Des enzymes spécifiques, les déubiquitylases, sont responsables du clivage des chaînes de polyubiquitine fixées sur les substrats à dégrader, générant ainsi des monomères d'ubiquitine libres et de nouveau disponibles dans la cellule. Elles sont également impliquées dans la maturation protéolytique du précurseur polypeptidique de l'ubiquitine, pour libérer des monomères qui pourront fixer un substrat. Ces enzymes peuvent aussi être associées au protéasome et promouvoir la dégradation du substrat, en clivant les chaînes d'ubiquitine interférant avec l'entrée de la protéine dans le corps 20S (Ciechanover et al., 2000) (**Figure 8**).

La dégradation des peptides issus du protéasome s'achève rapidement dans le cytoplasme ou le noyau, sous l'action d'autres enzymes. Alternativement, ces peptides peuvent être transférés dans le réticulum endoplasmique rugueux, pour être ensuite chargés sur des molécules du CMH-I et présentés à la surface cellulaire au système immunitaire (Rock et al., 2002).

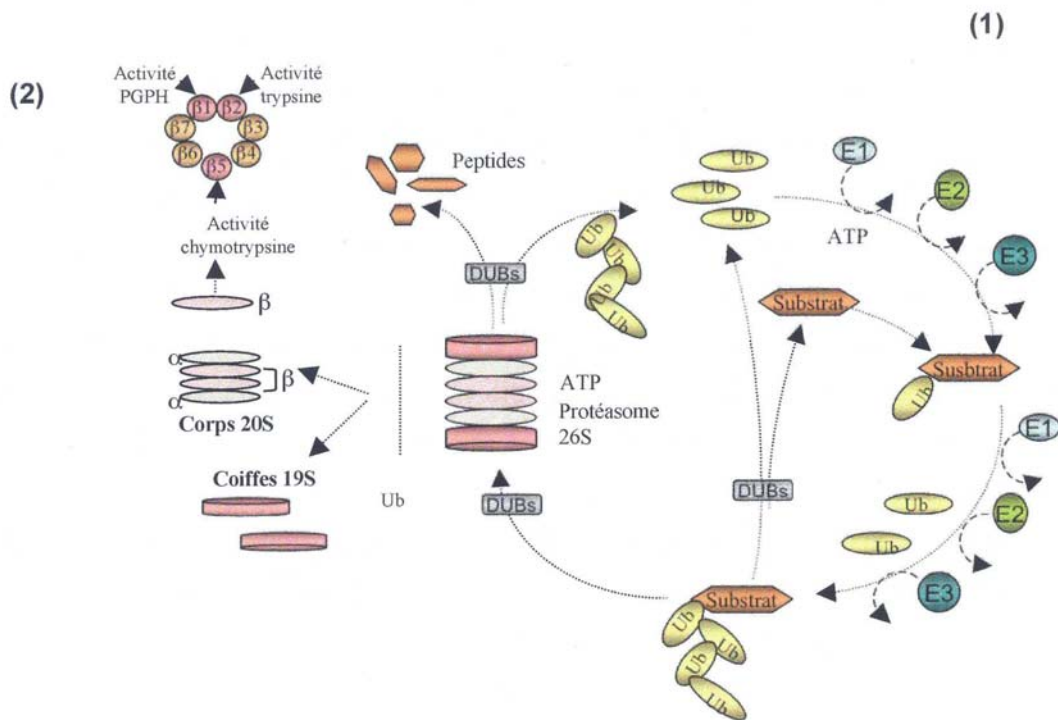


Figure 8 : L'ubiquitine et la voie protéolytique.

(1) Un puis plusieurs monomères d'ubiquitine se fixent sur le substrat, pour former une chaîne de polyubiquitine qui sera reconnue par le protéasome 26S. Le substrat est alors dégradé en peptides, alors que les monomères d'ubiquitine sont régénérés sous l'action de déubiquitylases (DUBs). Ces dernières interviennent également à l'entrée du protéasome 26S, pour cliver les monomères d'ubiquitine qui interfèrent avec le passage du substrat dans le cylindre protéolytique. Les DUBs sont également capables de déubiquityler spécifiquement certains substrats sans passer par le protéasome, pour recycler les protéines.

(2) Le protéasome 26S est formé d'un corps catalytique, ou corps 20S, associé à deux coiffes régulatrices 19S. Le corps 20S est constitué de quatre anneaux composés de sept sous-unités α ou β . Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, et $\beta 5$ de chaque anneau β portent les activités protéolytiques PGPH (*post-glutamyl peptide hydrolysis*), trypsine et chymotrypsine respectivement. Les coiffes portent les activités régulatrices : elles jouent le rôle de chaperons et permettent le passage des substrats à travers le corps 20S.

Plusieurs signaux de dégradation, présents dans la séquence du substrat qui sera ubiquitylé puis dégradé, ont été décrits. Parmi eux, la nature du résidu en position Nter semble être un facteur déterminant de la stabilité d'une protéine dans la cellule, une relation appelée « *N-end rule pathway* » (Varshavsky, 1996). Ce signal, appelé « *N-Degron* », nécessite la présence à proximité d'une lysine qui sera la cible de l'ubiquitylation, pour provoquer la dégradation du substrat. Ce scénario semble n'être rencontré que pour une petite partie des protéines cellulaires (Ciechanover et al., 2000).

Un autre signal est la phosphorylation du substrat, qui permet sa reconnaissance par une ubiquitine E3 ligase. Cette dernière peut alors induire l'ubiquitination sur un résidu lysine présente à proximité du site phosphorylé de la protéine. En particulier, des séquences riches en proline, glutamine, serine et thréonine (séquences « PEST »), sont des sites de phosphorylation qui induisent la liaison de l'ubiquitine et envoient la protéine vers la dégradation (Rechsteiner and Rogers, 1996). C'est le cas par exemple pour le facteur I κ -B α , l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B, qui lui est associé en un complexe inactif dans le cytoplasme. La phosphorylation de I κ -B α en réponse à divers stimuli extracellulaires entraîne sa polyubiquitylation et sa dégradation par le protéasome (Baeuerle and Baltimore, 1996). Le facteur NF- κ B est ainsi libéré de son inhibiteur et peut atteindre le noyau pour exercer sa fonction d'activateur spécifique de la transcription. Par contre, dans d'autres cas, la phosphorylation empêche la dégradation de la protéine, en inhibant l'accès de l'ubiquitine sur la protéine. Par exemple, la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun par une protéine kinase de la famille MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), empêche son ubiquitylation et permet son activation (Musti et al., 1997).

L'interaction avec une autre protéine peut également modifier la durée de vie du substrat, en recrutant des acteurs du système de dégradation par l'ubiquitine. L'exemple le plus illustré est celui du régulateur transcriptionnel p53, dont la durée de vie est écourtée suite à la fixation de la protéine E6 du papillomavirus humain (HPV) (Scheffner et al., 1990). Cette interaction provoque le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 E6-AP (*E6-associated protein*), d'où la polyubiquitylation et la dégradation de p53.

D'autres séquences signal ont été décrites, qui semblent nécessaires à la reconnaissance par l'ubiquitine, mais elles sont moins bien définies et souvent limitées à un groupe de protéines.

b) L'ubiquitine et le trafic intracellulaire

L'ubiquitylation joue également un rôle important dans le mouvement des protéines entre les différents compartiments cellulaires (Wojcik, 2001). En effet, le système ubiquitine est impliqué dans l'internalisation de protéines, ainsi que dans leur acheminement vers d'autres compartiments de la cellule, comme l'appareil de Golgi, le système endosomal ou les vacuoles. Dans la plupart des cas, la monoubiquitylation ou la poly-monoubiquitylation est un signal d'internalisation d'une protéine transmembranaire, et non un signal de dégradation par le protéasome (Hicke, 2001). Les chaînes d'ubiquitine liées par la lysine 63 adoptent une

conformation différente des chaînes liées par K48 et sont un signal d'endocytose (Varadan et al., 2004). De nombreux récepteurs membranaires et des canaux ioniques présents dans la membrane plasmique, souvent impliqués dans des fonctions physiologiques essentielles à la cellule, sont internalisés de cette manière (Staub and Rotin, 2006). Ainsi, après fixation de leur ligand, les récepteurs peuvent être ubiquitylés et internalisés, pour être ensuite dirigés vers d'autres compartiments cellulaires, dont l'issue finale est en général la dégradation dans les lysosomes. L'ubiquitine participe ainsi aux étapes de tri et de transport des protéines internalisées jusque dans les endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (MVB). Ces MVB peuvent fusionner avec les lysosomes, provoquant la dégradation des protéines, ou s'accumuler sous la membrane plasmique et former un exosome ou lysosome sécrétoire qui libère son contenu à l'extérieur de la cellule (**Figure 9**).

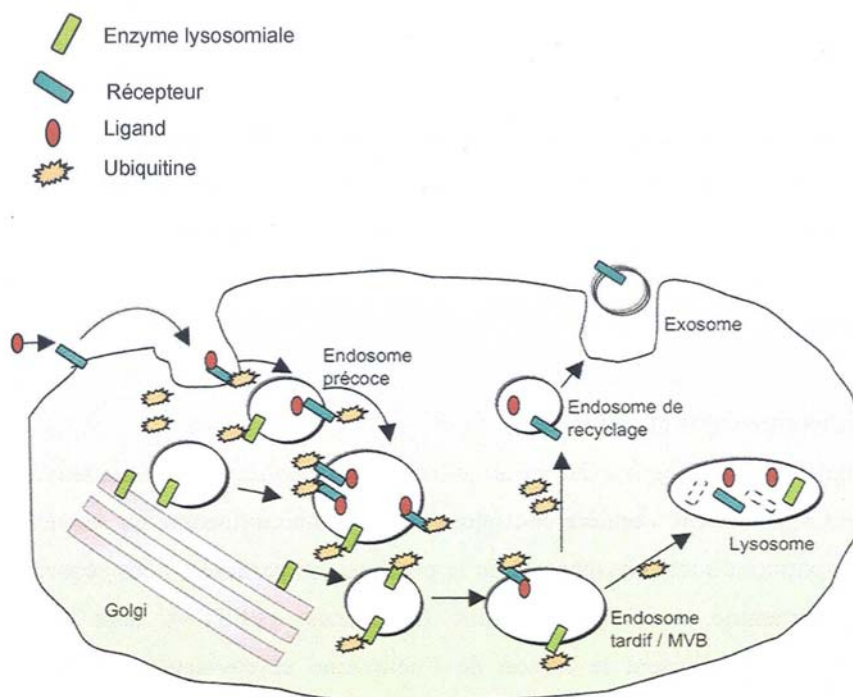


Figure 9 : L'ubiquitine et le trafic intracellulaire.

Schéma simplifié du rôle de l'ubiquitine dans le transport intracellulaire. De nombreux récepteurs sont ubiquitylés après fixation de leur ligand, puis internalisés par endocytose. Ils atteignent ainsi les endosomes précoces et sont triés jusque vers les endosomes tardifs ou MVB. Les protéines sont ensuite adressées vers les lysosomes pour y être dégradées, ou recyclées via des endosomes de recyclage et sécrétées par exocytose. Des nombreuses protéines issues de l'appareil de Golgi sont également recrutées dans les endosomes après modification par l'ubiquitine. Il en est le cas par exemple pour les enzymes lysosomiales, qui pourront atteindre les MVB puis les lysosomes grâce à l'ubiquitine.

Un des premiers exemples identifié a été le récepteur Ste2 chez la Levure *S.cerevisiae*. Ste2 est une protéine membranaire couplée aux protéines G et liant le facteur α , une phéromone impliquée dans le phénomène d'accouplement cellulaire (Hicke and Riezman, 1996). L'endocytose de Ste2, qui est internalisé lentement de manière constitutive, est fortement stimulée par la liaison de phéromone. Cette liaison induit l'ubiquitylation de Ste2 sur une lysine exposée dans sa partie cytoplasmique, modification nécessaire et suffisante pour provoquer l'endocytose de Ste2 puis sa dégradation dans les lysosomes.

De très nombreux exemples similaires ont été décrits dans la littérature. Parmi eux, plusieurs récepteurs de croissance sont régulés par la reconnaissance de leur ligand, qui induit des modifications du récepteur et modulent les voies de signalisation cellulaire. Par exemple, la fixation de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) entraîne la phosphorylation du récepteur EGFR dans sa partie cytoplasmique. Ce dernier ainsi phosphorylé recrute une ligase qui va permettre son ubiquitylation et son internalisation (Staub and Rotin, 2006).

c) L'ubiquitine comme régulateur de l'activité protéique

La modification d'une protéine par liaison d'un ou plusieurs monomères d'ubiquitine peut agir directement sur l'activité de cette protéine. En effet, il a été montré que la formation d'une chaîne d'ubiquitine via les lysines 63 peut moduler la fonction d'un substrat, en induisant un changement conformationnel qui permet de nouvelles interactions avec d'autres partenaires ou en modifiant sa localisation intracellulaire (Sun and Chen, 2004).

Par cette action, l'ubiquitine permet en particulier de contrôler la transcription. En effet, l'ubiquitylation de l'inhibiteur $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$ entraîne sa dégradation par le protéasome, ce qui libère le facteur de transcription NF- κB qui pourra aller au noyau et activer des gènes spécifiques. Par ailleurs, l'ubiquitylation joue un rôle direct sur la structure de la chromatine et stimule la transcription (Muratani and Tansey, 2003). En effet, certains facteurs activateurs de la transcription sont directement ubiquitylés, comme l'ARN polymérase II ou les histones. La fixation de l'ubiquitine peut provoquer d'autres modifications comme la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II et des nucléosomes. Le protéasome 26S peut alors être recruté sur l'ARN polymérase II, ce qui stimule l'élongation en libérant l'ARN polymérase II et les histones du site promoteur (Kurosu and Perterlin, 2004) (**Figure 10**).

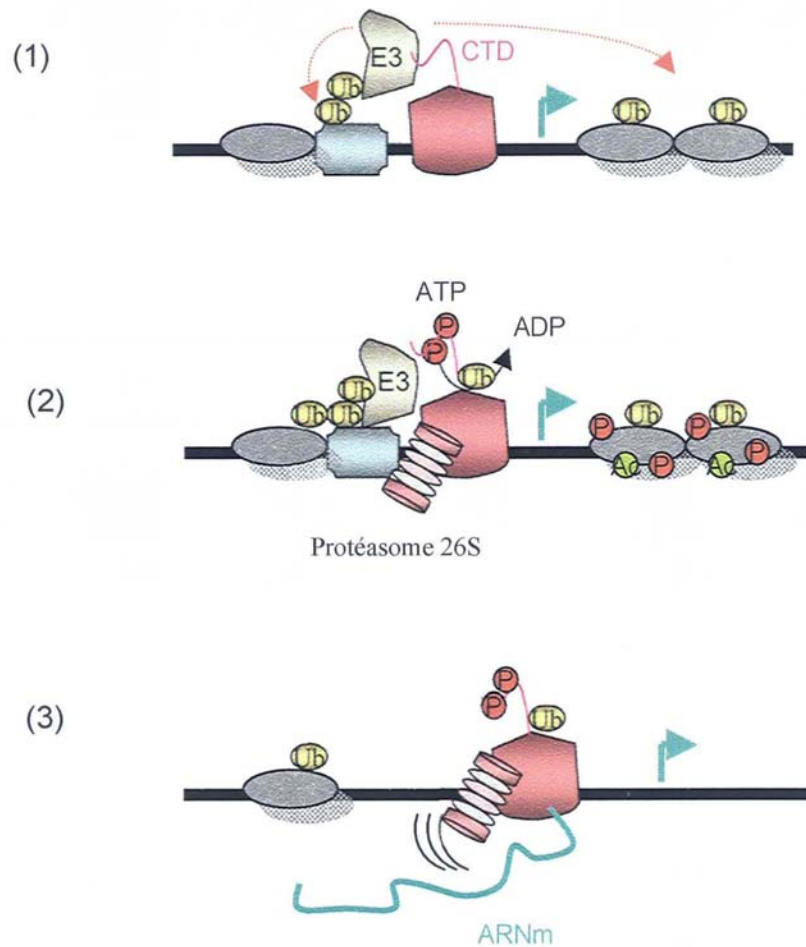


Figure 10 : Modèle de régulation de la transcription par l'ubiquitine.

(1) La liaison d'un facteur activateur de la transcription au niveau du site d'initiation de la transcription induit le recrutement de l'ARN polymérase II ainsi que d'une ligase d'ubiquitine (E3). (2) Celle-ci permet l'ubiquitylation de nombreux facteurs dont l'ARN Pol II, des activateurs de la transcription et des histones. En conséquence, d'autres modifications ont lieu dans le complexe d'initiation de la transcription, et le protéasome est recruté sur l'ADN. (3) Ce dernier permet à l'ARN Pol II de se dissocier du site promoteur pour l'élongation de la transcription.

II.2. Les protéines SUMO

Le système ubiquitine n'est pas unique, et il existe plusieurs protéines apparentées ou UBL (*ubiquitine-like proteins*) dont les protéines SUMO (*Small Ubiquitin related Modifier*). Ces protéines peuvent de la même manière modifier des substrats et réguler leur activité.

Bien que le degré d'homologie de séquences avec l'ubiquitine soit relativement faible (environ 18%), les UBL possèdent la même structure tridimensionnelle que l'ubiquitine (Hochstrasser, 2000). De plus, le résidu en position carboxy-terminale - par où s'effectue la liaison covalente avec le substrat - est, comme pour l'ubiquitine, toujours une glycine.

Les modifications par sumoylation ont en général un rôle non protéolytique, mais elles modulent la localisation du substrat, ses interactions avec d'autres protéines, ou encore son activité. Les protéines SUMO sont ainsi impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme la régulation de l'expression des gènes et de la structure de la chromatine, la transduction de signaux, la surveillance du génome ou encore le trafic intracellulaire.

Il existe quatre protéines SUMO chez les Vertébrés, SUMO-1 à SUMO-4, qui ont des substrats en commun mais modifient préférentiellement l'un ou l'autre de ces substrats (Johnson, 2004).

II.2.1. Synthèse et activation

La sumoylation s'effectue en une cascade de réactions similaire à celle de l'ubiquitylation (**Figure 11**).

Comme pour l'ubiquitine, le précurseur est clivé par des protéases spécifiques à son extrémité carboxy-terminale pour exposer deux résidus glycine, qui sont reconnus par l'enzyme E1. SUMO est ensuite transférée sur l'enzyme de conjugaison E2, puis sur un résidu lysine de la protéine cible, sous l'action ou non d'une enzyme ligase E3. Cette réaction est réversible, et des protéases peuvent cliver spécifiquement la ou les molécules SUMO liées au substrat (Seeler and Dejean, 2001).

A l'heure actuelle, une seule enzyme E1 est connue, l'hétérodimère Aos1/Uba2 ou SAE1/SAE2 (*SUMO activating enzyme 1 and 2*), et il existe une unique enzyme E2, la protéine Ubc9 (UBE1 chez l'Homme). Trois protéines E3 ont été décrites, qui semblent nécessaires *in vivo* pour la reconnaissance spécifique du substrat, et jouent le rôle d'adaptateurs entre E2 et la protéine cible. Toutefois, une sumoylation correcte est possible *in vitro* en l'absence de E3, et une séquence consensus sur les substrats liant directement E2 a été identifiée (Johnson, 2004).

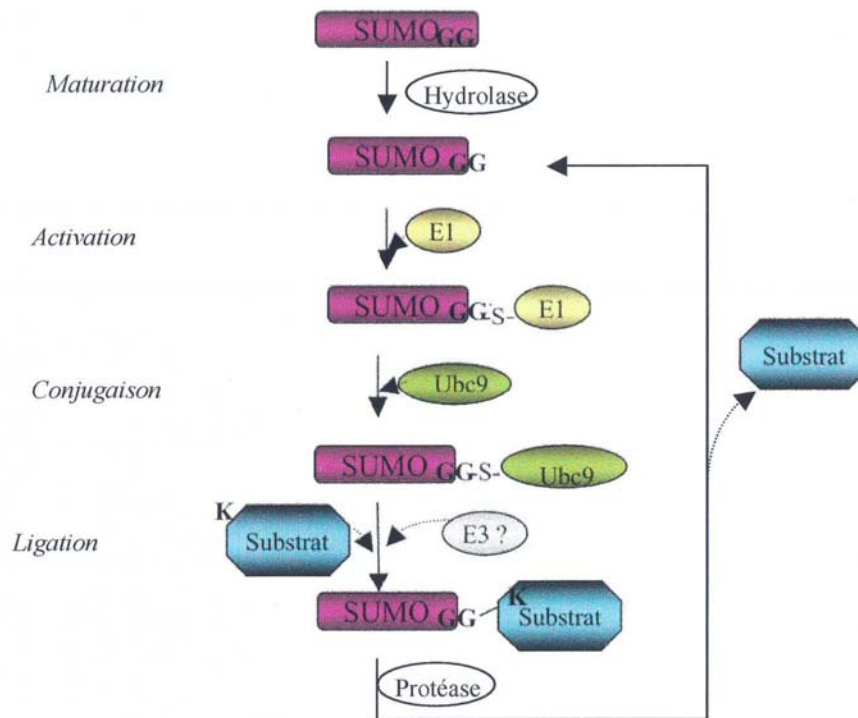


Figure 11: Le cycle de conjugaison de SUMO.

Les protéines SUMO sont traduites sous forme de précurseurs, qui sont clivés par des hydrolases à leur extrémité carboxy-terminale pour exposer un résidu glycine. SUMO est activée par l'enzyme E1, qui forme une liaison thioester avec le résidu glycine exposé. SUMO est ensuite transférée à l'enzyme E2, Ubc9, puis sur un résidu lysine du substrat, avec la participation ou non d'une ligase E3. Des protéases spécifiques régulent le cycle de conjugaison en clivant la ou les molécules SUMO fixées sur le substrat, pour les régénérer.

Un des premiers cas de sumoylation mis en évidence a été celui de la protéine RanGAP1 via une des enzymes E3, la protéine RanBP2 (Matunis et al., 1996). RanBP2 (*Ran Binding Protein 2*) est une petite protéine des pores nucléaires nécessaire au transport des protéines vers le cytoplasme. RanGAP1 (*RanGTPase Activating Protein 1*) est une protéine cytoplasmique qui régule le cycle GTP/GDP de la protéine GTPase Ran, impliquée dans le transport bidirectionnel entre le noyau et le cytoplasme. La liaison de SUMO sur RanGAP1 lui permet d'accéder aux NPC en fixant les filaments cytoplasmiques des pores nucléaires, pour former un système de transport nucléaire fonctionnel.

II.2.2. Rôles de la sumoylation

A l'image de l'ubiquitine, les modifications par SUMO jouent un rôle dans la régulation de divers phénomènes biologiques (Seeler and Dejean, 2001). De nombreuses protéines sumoylées sont des protéines nucléaires impliquées dans le contrôle de la transcription, la modulation de la structure chromatinienne ou le maintien de l'intégrité du génome. D'autres protéines modifiées par SUMO font partie des cascades de transduction de signaux extracellulaires ou des systèmes de transport nucléocytoplasmique (**Figure 12**). De nombreux auteurs ont étudié plus précisément la protéine SUMO-1, dont je détaillerai quelques exemples de fonctions connues.

<i>Substrat</i>	<i>Fonction exercée par SUMO</i>
<i>Corps PML</i> PML SP100	Formation des corps PML
<i>Transport nucléaire</i> RanGAP1	Dirigée via RanBP2 jusque vers les pores nucléaires
<i>Transduction de signal</i> Mdm2 I κ B α	Empêche l'ubiquitylation de p53 par Mdm2 Antagonise l'ubiquitylation : Inhibition de NF- κ B
<i>Facteurs de transcription</i> p53 c-Jun	Légère stimulation de la <i>trans</i> -activation et de la réponse apoptotique Légère réduction de l'activation transcriptionnelle
<i>Protéines virales</i> CMV-IE1 BPV-E1 HPV-E1 HIV-1 p6	Non identifiée Translocation nucléaire Translocation nucléaire Modulation de son activité

Figure 12 : Exemples de substrats pour la sumoylation et de ses différentes fonctions.

Ce tableau cite quelques exemples de protéines cellulaires ou virales qui peuvent être sumoylées, et indique un rôle pléiotrope de SUMO dans la localisation intracellulaire, la modulation de l'activité de facteurs de transcription, la transduction de signal ou encore la régulation de protéines virales.

SUMO-1 est capable de réguler la localisation intracellulaire de diverses protéines cellulaires ou virales. Un exemple de cette fonction de SUMO a été décrit par la sumoylation de RanGAP1, qui induit sa localisation périnucléaire (Matunis et al., 1996). La sumoylation est donc impliquée dans le recyclage des protéines navettes entre le noyau et le cytoplasme,

processus notamment très important lors du transport des ARN messagers dans le cytoplasme pour leur traduction en protéines.

Par ailleurs, certaines protéines virales sont véhiculées dans des compartiments spécifiques après sumoylation. C'est le cas de la protéine E1 des papillomavirus bovin et humain, qui est redirigée vers le noyau une fois modifiée par SUMO, pour y exercer ses fonctions activatrices sur l'expression du génome viral (Rangasamy et al., 2000).

SUMO-1 est également capable de moduler l'activité protéolytique de l'ubiquitine, en entrant en compétition pour la fixation des substrats et empêchant leur dégradation par le protéasome. De cette manière, SUMO-1, conjointement avec l'ubiquitine, joue un rôle dans la régulation de la transcription. Un exemple pertinent est celui du facteur I κ -B α (Desterro et al., 1998). La liaison de l'ubiquitine et de SUMO a lieu sur la même lysine, en position 21 de la séquence de I κ -B α . Il y a donc compétition entre polyubiquitylation et sumoylation sur I κ -B α , qui est dirigée par l'état de phosphorylation de ce facteur. En effet, la phosphorylation de I κ -B α provoque sa polyubiquitylation et sa dégradation, alors que I κ -B α non phosphorylé est modifié par SUMO et ne sera pas dégradé, inhibant ainsi l'action du facteur NF- κ B (**Figure 13**).

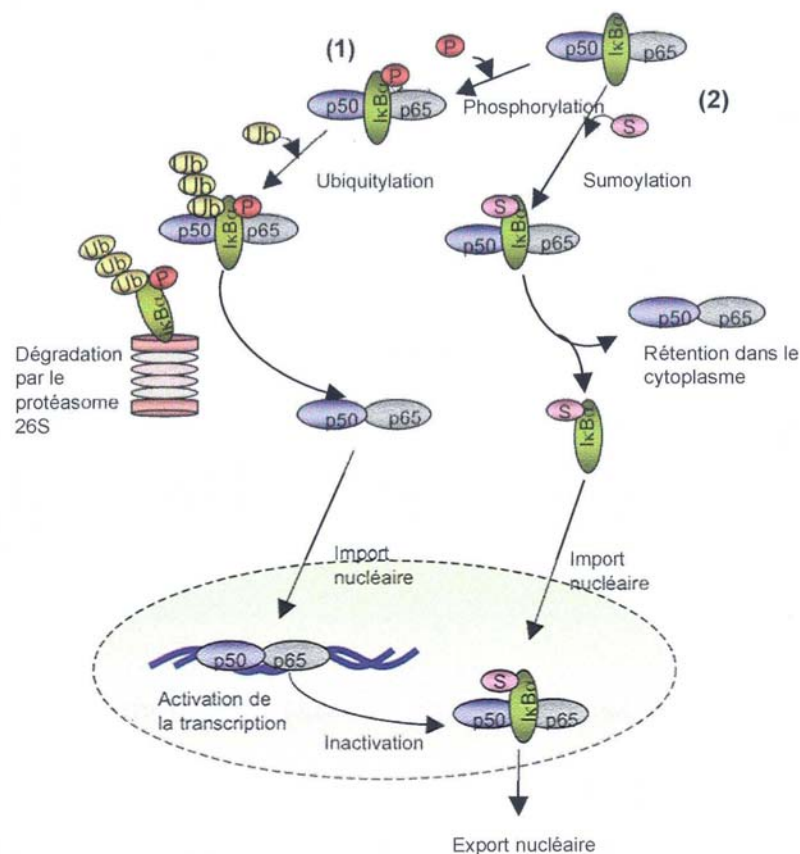


Figure 13 : Régulation de la voie NF- κ B par l'ubiquitine et SUMO.

L'activité des facteurs de transcription de la famille NF- κ B est régulée par des protéines I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*), qui sont elles-mêmes modulées par l'ubiquitine et SUMO. Un exemple de régulation du dimère p50/p65 par l'inhibiteur I κ B α est décrit sur ce schéma. (1) Suite à un stimulus externe, le facteur I κ B α est phosphorylé, ce qui entraîne sa polyubiquitylation. Il est alors dégradé par le protéasome 26S, ce qui libère le dimère p50/p65 qui peut aller au noyau et activer des gènes spécifiques. (2) I κ B α peut également être sumoylé sur les mêmes lysines cibles de l'ubiquitine. Dans ce cas, I κ B α n'est pas dirigé vers le protéasome, et une partie peut atteindre le noyau pour fixer les dimères p50/p65 et les envoyer dans le cytoplasme.

Une compétition similaire entre ubiquitylation et sumoylation a été rapportée pour la régulation de p53. En effet, SUMO-1 modifie directement p53 et stimule modérément sa fonction transcriptionnelle (Müller et al., 2000). La sumoylation intervient également dans l'activation de p53 suite à un stress génotoxique. En effet, il a été montré que, suite à un stress, SUMO est capable de réduire l'action de la ligase E3 spécifique de p53, la protéine Mdm2 (*Murine double minute 2*), en la séquestrant dans les nucléoles. Ceci empêche l'ubiquitylation de p53 et stabilise la protéine (Bernardi et al., 2004).

La sumoylation est également impliquée dans la formation de complexes protéiques, en modulant les interactions protéine-protéine. SUMO intervient ainsi dans l'assemblage de corps nucléaires spécifiques, les corps PML (*Promyelocytic leukemia*). La sumoylation de la protéine PML est nécessaire à la formation des corps PML et pour l'accumulation d'autres protéines qui sont elles-mêmes sumoylées (Müller et al., 1998). Ces corps nucléaires servent de réservoirs de facteurs impliqués dans la régulation de la transcription et des réponses aux dommages à l'ADN. L'absence de sumoylation de PML, due par exemple à des mutations sur les résidus lysine nécessaires à la conjugaison de SUMO, provoque la dissociation des corps nucléaires et la dissémination de ses constituants. Cette dissociation est à l'origine de certaines pathologies graves chez l'Homme comme la leucémie promyélocytaire aigüe. Dans ce cas, la protéine PML est liée au récepteur de l'acide α rétinolique (RAR α), et ne peut pas être sumoylée (Borden, 2002).

Les corps PML peuvent également être dissociés suite à une infection par certains virus à ADN comme le virus de l'Herpès (*Herpes Simplex Virus*, HSV) ou le cytomégalovirus humain (HCMV). En effet, les protéines précoces de ces virus, ICP0 pour HSV (*infected cell protein 0*) et IE1 pour HCMV (*immediate early protein 1*), se lient à la protéine PML et empêchent sa sumoylation, ainsi que celle d'autres constituants des corps PML (Boggio and Chiocca, 2006).

Par sa participation dans l'assemblage des corps nucléaires PML, SUMO joue un rôle dans la régulation de la transcription. En effet, la sumoylation séquestre des activateurs de la transcription dans des domaines subnucléaires, les « déconnectant » ainsi physiquement du reste du nucléoplasme (Muratani and Tansey, 2003).

II.3. Exemples de pathologies liés aux systèmes ubiquitine et SUMO et de leur utilisation par des virus

Etant donné l'immense diversité de substrats des protéines ubiquitine et SUMO ainsi que la complexité des cascades de réaction mises en œuvre, il n'est pas surprenant que des aberrations dans ces systèmes soient à l'origine de pathologies sévères. Quelques exemples de maladies associées à un dysfonctionnement de ces voies de régulation sont décrits ci-après.

II.3.1. Pathologies associée aux systèmes ubiquitine ou SUMO

a) Maladies génétiques et neurodégénératives

Plusieurs maladies génétiques sont dues à des défauts d'ubiquitylation, qui peuvent provoquer la dégradation massive d'une protéine, comme le régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) (Riordan, 2005). A l'inverse, la dégradation d'une protéine peut être inhibée par l'absence d'ubiquitylation, entraînant son activité excessive dans la cellule. Il en est par exemple le cas pour le canal sodium épithélial (ENaC), dont l'hyperactivité peut entraîner des cas d'hypertension sévères (Abriel et al., 1999).

Des maladies neurodégénératives sont également dues à l'accumulation de protéines anormales qui sont ubiquitylées mais ne sont pas dégradées correctement par le protéasome, et forment alors des agrégats toxiques pour la cellule. La maladie d'Alzheimer est un exemple pertinent, expliqué par l'accumulation d'agrégats de protéines APP (*amyloid precursor protein*). Ces fragments sont issus d'un mauvais clivage de la protéine APP membranaire, et semblent être modifiés par les protéines SUMO, ce qui empêche leur dégradation (Li et al., 2003).

Un autre exemple est celui de la maladie de Huntington, où des mutants de la protéine Huntingtine s'accumulent dans le noyau et dérèglent le système de dégradation par le protéasome. Ce dérèglement perturbe les grandes fonctions cellulaires comme la transduction de signal, la transcription, l'endocytose ou encore le trafic intracellulaire, ce qui provoque la dégénération des neurones (Landles and Bates, 2004). Ces protéines mutantes peuvent en effet être ubiquitylées, et s'accumulent ainsi dans le noyau et répriment l'expression de gènes. Dans le cytoplasme, leur ubiquitylation forme des agrégats toxiques qui contiennent également des protéines cellulaires, et qui semblent être détruits par autophagie, une voie de dégradation cytoplasmique impliquant des autophagosomes (Ravikumar and Rubinsztein, 2006). Leur destruction entraîne celle des protéines cellulaires associées, endommageant ainsi les fonctions cellulaires. D'une manière similaire, la sumoylation rend les protéines plus solubles, plus abondantes et donc plus toxiques pour les cellules.

b) Infection virale et cancer

Un autre exemple de dérèglement du système ubiquitine est celui du développement de cancer de l'utérus lié à l'infection par le papillomavirus humain (*Human papillomavirus, HPV*). Comme cité précédemment, l'oncoprotéine virale E6 induit la dégradation rapide du facteur suppresseur de tumeur p53, consécutive à son ubiquitylation. La protéine p53 est considérée comme le grand « gardien du génome », puisqu'elle permet le contrôle de l'intégrité du génome, et induit l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose suite à divers stress comme un dommage à l'ADN ou l'activation d'un oncogène (Bode and Dong, 2004). Dans des conditions cellulaires normales, p53 est ubiquitylée et rapidement dégradée par le protéasome. En cas de stress, elle n'est pas ubiquitylée et s'accumule dans le noyau sous forme de tétramères qui vont réguler l'expression de gènes cibles pour déclencher l'apoptose. Dans le cas d'une infection par HPV, la protéine virale E6 va servir de « pont » pour associer la ligase E3 E6-AP à p53, et permettre la réaction de conjugaison de l'ubiquitine sur p53, entraînant sa polyubiquitylation et sa rapide dégradation. Cette diminution drastique de p53 dans la cellule est impliquée dans le phénomène de transformation cellulaire et le développement du cancer lié au virus (Storey et al., 1998).

II.3.2. Modulation de l'infection virale grâce aux systèmes ubiquitine et SUMO

On sait maintenant que de nombreux virus interfèrent avec les voies ubiquitine et SUMO. En effet, les virus peuvent intervenir sur les modifications de certaines protéines cellulaires, en empêchant la fixation de l'ubiquitine ou de SUMO ou en activant le clivage des monomères déjà fixés, et moduler ainsi leur activité. D'autre part, les virus sont capables de recruter l'ubiquitine ou SUMO sur leurs propres protéines virales, profitant ainsi des systèmes cellulaires pour leur multiplication. Ainsi, certaines protéines virales sont capables d'interférer avec les cycles d'ubiquitylation ou de sumoylation des protéines cellulaires, pour modifier les fonctions de ces substrats ou exploitent les protéines ubiquitine ou SUMO au profit de leur propre fonction (**Figure 14**).

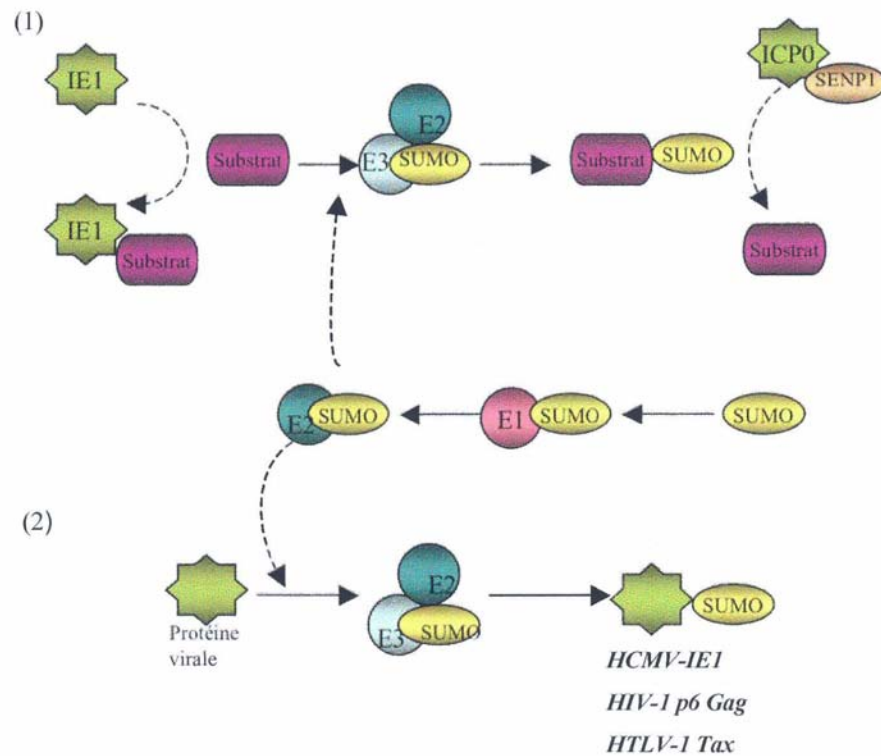


Figure 14 : Interaction entre protéines virales et le cycle de sumoylation cellulaire.

- (1) La protéine IE1 du virus HCMV est capable d'empêcher la sumoylation *de novo* de substrats comme la protéine PML, en interagissant directement avec celui-ci. ICP0 du virus HSV stimule la désomoylation de substrats similaires, en recrutant une protéase spécifique de SUMO (*Sentrin-specific protease*, SENP).
- (2) D'autres protéines virales exploitent les protéines SUMO de la cellule pour leur propre sumoylation et la régulation de leur activité.

a) Echappement à la réponse immunitaire

Deux exemples de virus qui utilisent le système ubiquitine pour échapper à la surveillance immunitaire peuvent être cités. La protéine EBNA-1 du virus d'Epstein-Barr (*Epstein-Barr nuclear antigen-1*) est présente de manière persistante chez l'hôte infecté, et est associée au développement des cancers dus à EBV. A l'inverse des trois autres protéines EBNA, EBNA-1 n'est pas dégradée pour être présentée via le MHC et déclencher une réponse immunitaire par les cellules T cytotoxiques (Levitskaya et al., 1995). Elle possède en effet une séquence

répétée glycine-alanine, qui constitue un élément empêchant sa dégradation par le protéasome 26S.

L'autre exemple est celui des protéines US2 et US11 du cytomégalo virus (CMV). Celles-ci inhibent l'expression des chaînes lourdes du MHC de classe 1, en entraînant vers le cytoplasme les molécules néosynthétisées issues du réticulum endoplasmique, qui seront déglycosylées puis ubiquitylées, pour être ensuite dégradées par le protéasome (Van der Wal et al., 2002). En privant les cellules de leurs molécules MHC, les protéines US2 et US11 limitent la présentation des peptides viraux antigéniques, permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire et de se répliquer.

b) Modulation des réponses immunitaire et inflammatoire

Des désordres au niveau des réponses immunitaires et inflammatoires peuvent également être la conséquence d'un mauvais fonctionnement ou d'un détournement des fonctions de l'ubiquitine. En particulier, l'activation de NF- κ B stimule l'expression de nombreuses cytokines, de molécules d'adhésion, de récepteurs et d'autres protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Cette voie NF- κ B fait intervenir plusieurs réactions en cascade, impliquant de nombreux acteurs moléculaires dont l'activité est régulée entre autres par l'ubiquitine et SUMO. Un défaut de ces systèmes entraîne donc rapidement des dysfonctionnements de la voie NF- κ B, provoquant généralement de graves conséquences sur les réactions immunitaires.

Un des exemples les plus décrits est celui de la protéine Tax du virus HTLV-1 (*Human T cell Leukemia Virus Type 1*), impliquée dans le processus de transformation des lymphocytes, associée à la leucémie aigüe de l'Homme adulte. Cet activateur transcriptionnel viral peut être modifié sur les mêmes résidus lysine soit par l'ubiquitine, soit par SUMO, ce qui détermine la part de protéines Tax nucléaires de la portion cytoplasmique (Lamsoul et al., 2005). Ainsi, l'ubiquitylation de Tax dans le cytoplasme est nécessaire à sa liaison au corps du protéasome, mais elle n'induit pas sa dégradation (Chiari et al., 2004). Elle lui permet au contraire d'activer les étapes cytoplasmiques de la voie NF- κ B, en interagissant avec NEMO/IKK γ (*NF- κ B essential modulator*). Ceci provoque la dégradation par le protéasome de I κ -B et la translocation nucléaire du facteur de transcription RelA, une sous-unité de NF- κ B. Tax nucléaire est sumoylée, ce qui lui permet de promouvoir l'assemblage des corps

nucléaires PML qui contiennent de nombreux co-activateurs de la transcription dont RelA, induisant alors une activation forte de la transcription de gènes spécifiques de réponse à Tax (Nasr et al., 2006). Des auteurs ont également montré que dans le noyau, l'ubiquitylation de Tax réduit modestement son activité transcriptionnelle (Peloponese et al., 2004). Ainsi l'ubiquitylation et la sumoylation de Tax dans les différents compartiments cellulaires sont essentielles pour la régulation de son activité transcriptionnelle et le développement de la leucémie due à HTLV (Figure 15).

La protéine Tat du HIV-1 est également capable de moduler l'action du facteur NF- κ B pour réguler les réponses immunitaires dues à l'infection virale. J'en détaillerai les aspects principaux dans un prochain paragraphe.

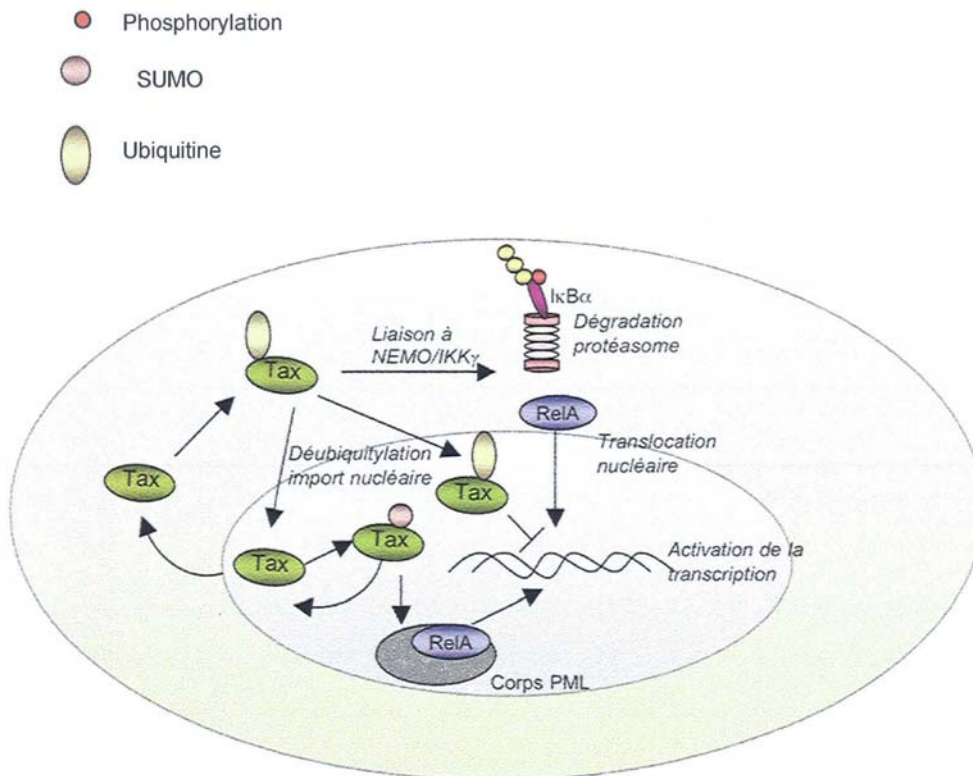


Figure 15 : Modèle de régulation de Tax par l'ubiquitine et SUMO.

La protéine Tax du virus HTLV-1 peut être ubiquitylée dans le cytoplasme, ce qui lui permet d'interagir avec NEMO/IKK γ pour induire la dégradation de I κ B α . Ceci provoque la translocation de RelA dans le noyau et l'activation de la transcription de gènes spécifiques. Tax déubiquitylée peut aller au noyau et être sumoylée. Elle induit ainsi la formation des corps PML, en recrutant différents facteurs dont RelA, pour permettre une transcription optimale. Au contraire, l'ubiquitylation de Tax dans le noyau semble réduire l'activité transcriptionnelle.

c) Blocage de l'action de facteurs cellulaires antiviraux

Certaines cellules sont dites « restrictives » à l'infection par le HIV-1, comme les macrophages et les cellules T primaires. Cette particularité est due à la présence dans les cellules de facteurs antiviraux, capables de supprimer l'infectivité du HIV-1. Parmi eux, la protéine APOBEC3G fait l'objet de très nombreuses investigations, puisqu'elle a récemment été identifiée comme la cible principale de la protéine virale Vif. APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) est une protéine impliquée dans la résistance innée à l'infection rétrovirale (Chiu and Greene, 2006). Cette enzyme est capable de bloquer la rentrée du virus dans les cellules « restrictives », et peut s'incorporer aux virions néoformés. Elle catalyse la désamination des bases dC (Cytidine) en dU (Uracile) lors de la transcription inverse, ce qui provoque des mutations dans les séquences virales nouvellement synthétisées (Lecossier et al., 2003). Ces hypermutations entraînent des défauts de la transcription inverse et peuvent provoquer un blocage de l'intégration du provirus dans le génome cellulaire. Vif est capable d'empêcher l'action de APOBEC3G, en limitant d'une part la traduction des ARNm APOBEC3G, et également en dirigeant la protéine vers la voie de dégradation par le protéasome. En effet, Vif interagit avec APOBEC3G et recrute un complexe E3 ligase constitué des protéines Culline 5, Elongine B, Elongine C et Rbx1, ce qui provoque l'ubiquitylation de APOBEC3G (Santa-Marta et al., 2005 ; Kobayashi et al., 2005). (**Figure 16**)

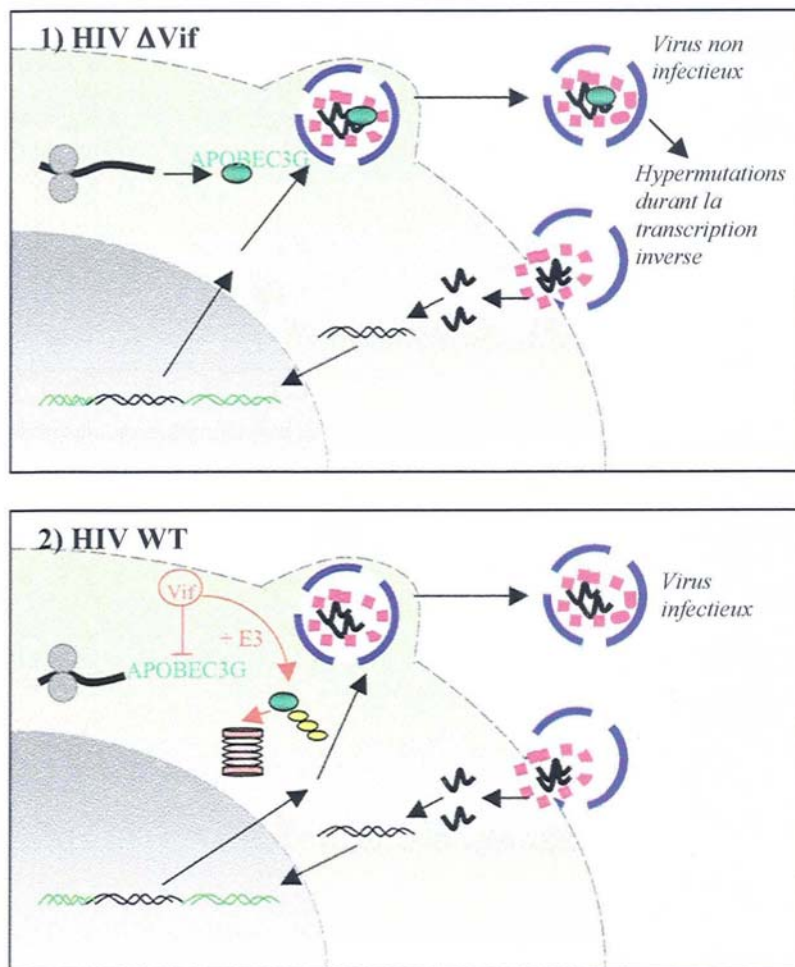


Figure 16 : Mécanismes d'action de APOBEC3G et de la protéine virale Vif.

- 1) APOBEC3G est un facteur de restriction cellulaire capable de bloquer l'entrée du virus dans les cellules « restrictives ». En l'absence d'une protéine Vif fonctionnelle, APOBEC3G est incorporée dans les virions et provoque des hypermutations du génome viral lors de la transcription inverse. Ces dernières peuvent altérer le cycle viral, et les nouveaux virions ne sont pas ou peu infectieux.
- 2) Dans le cadre d'une infection par HIV-1 des cellules « permissives », Vif est capable de bloquer l'action de APOBEC3G en empêchant la traduction des ARNm APOBOEC3G et en induisant la dégradation de la protéine. En effet, Vif recrute des complexes E3 ligases cellulaires, qui vont entraîner la polyubiquitylation de APOBEC3G et sa reconnaissance par le protéasome 26S.

d) Libération des nouveaux virions

De nombreux virus utilisent la machinerie cellulaire d'exocytose passant par les MVB et régulée par l'ubiquitine pour le bourgeonnement et la libération de leurs particules virales

néoformées. Parmi eux peuvent être cités les rétrovirus HIV-1 et HTLV-1, le virus Ebola, le virus Lassa et d'autres virus animaux.

Des auteurs ont montré que le peptide p6 de la protéine Gag de HIV-1, ou *Late Domain*, contient un motif PTAP interagissant avec le domaine UEV du facteur Tsg101 (Martin-Serrano et al., 2001). Tsg101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) appartient à une famille de complexes intervenant dans le tri protéique, les complexes ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Ceux-ci reconnaissent les protéines ubiquitylées et les envoient vers les compartiments endosomaux, pour former des endosomes tardifs ou MVB (*multivesicular body*). Tsg101 se lie également à l'ubiquitine fixée sur p6, ce qui semble favoriser l'interaction entre Gag et les complexes ESCRT (Nguyen et al., 2003). p6 peut également interagir avec AIP1/Alix, une protéine qui se lie à la fois à Tsg101 et au complexe ESCRT III, ce qui permet de recruter ESCRT III pour la phase finale du bourgeonnement membranaire, c'est-à-dire l'invagination de la membrane et la libération des complexes ESCRT sous l'action de l'ATPase Vsp4 (Staub and Rotin, 2006). Ainsi, en interagissant avec les complexes ESCRT, p6 détourne l'ensemble de la machinerie d'escorte cellulaire pour recruter Gag sous la membrane et permettre l'assemblage et la libération de nouvelles particules virales. De cette manière, le virus peut rentrer dans les endosomes tardifs pour être libéré par exocytose, ou bourgeonner directement à la membrane cellulaire. Ceci explique pourquoi des auteurs ont récemment montré que, dans certains types de cellules infectées par HIV-1 comme les cellules épithéliales, les particules virales sont majoritairement retrouvées dans les MVB et non à la membrane plasmique (Grigorov et al, 2006).

Le rôle de l'ubiquitylation de Gag du HIV-1 dans les étapes de bourgeonnement n'est pas très clair, mais on sait qu'une partie du pool de Gag est monoubiquitylée dans les nouveaux virions et que l'inhibition de la machinerie du protéasome empêche la libération des particules virales (Ott et al., 2003 ; Gottwein and Kräusslich, 2005). Il semblerait que l'ubiquitine renforce la liaison entre Gag p6 et Tsg101, qui reconnaît particulièrement les protéines ubiquitylées (Nguyen et al., 2003). **(Figure 17)**

La protéine Gag du rétrovirus HTLV-1 possède également un motif particulier par lequel elle est ubiquitylée, ce qui lui permet d'interagir avec Tsg101, pour être acheminée vers les MVB d'une manière similaire à la protéine Gag du HIV-1 (Blot et al., 2004).

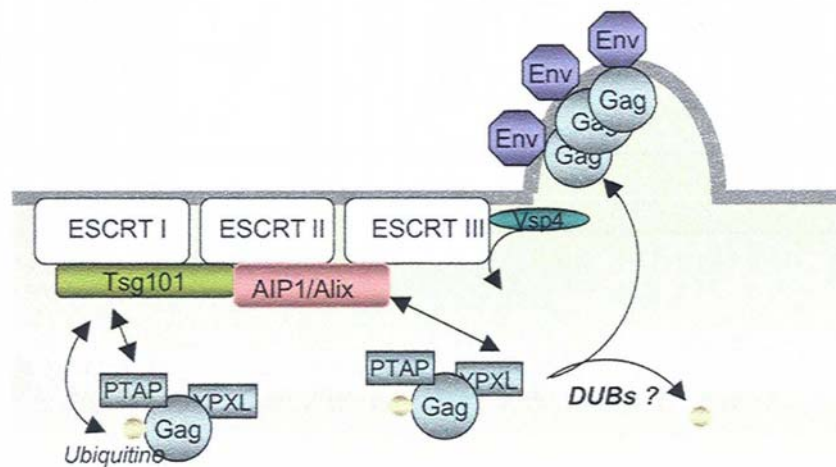


Figure 17 : Bourgeonnement du HIV-1.

L'étape de bourgeonnement du virion est dirigée par la protéine virale Gag p6 et les complexes cellulaires ESCRT de la cellule. Gag interagit avec le facteur Tsg101 via son domaine PTAP, et peut également s'associer avec AIP1/Alix, qui fixe Tsg101 et le complexe ESCRT III. Sous l'action de l'ATPase Vsp4, il y a invagination de la membrane et libération des complexes ESCRT. Gag est alors accumulée sous la membrane où elle s'associe avec les protéines d'enveloppe des virus. Le rôle de l'ubiquitine dans le bourgeonnement du virus n'est pas bien défini, mais elle semble renforcer la liaison entre Gag p6 et Tsg101. Elle serait dissociée, ou du moins en partie, par des déubiquitylases (DUBs) avant l'assemblage du virion.

La liste des fonctions des protéines ubiquitine et SUMO est encore longue, et elle continue de s'étoffer. Les quelques exemples cités dans ces paragraphes montrent la diversité et l'importance de l'ubiquitylation et de la sumoylation dans la plupart des processus cellulaires. En collaboration ou en compétition avec d'autres modifications comme la phosphorylation ou l'acétylation, les systèmes ubiquitine et SUMO représentent une dynamique de modifications post-traductionnelles successives et parfaitement hiérarchisées, permettant la régulation spatio-temporelle des différents événements cellulaires.

De nombreux virus ont élaboré des stratégies afin de profiter des systèmes cellulaires pour leur réplication. Alors que certains dévient certaines voies de modifications post-traductionnelles pour échapper à la réponse immunitaire, d'autres utilisent directement ces

systèmes afin de réguler l'activité de leurs propres protéines. Dans le cas particulier du HIV-1, nous avons vu que plusieurs de ses protéines virales exploitent les systèmes ubiquitine et SUMO à leur profit. Par ailleurs, le HIV-1 exprime plusieurs protéines virales régulatrices, essentielles pour une production virale efficace. Un intérêt tout particulier peut être donné sur les deux protéines Tat et Rev, puisqu'elles sont des acteurs clés de la réplication du virus. En effet, la protéine régulatrice Tat exploite la machinerie cellulaire ubiquitine pour sa fonction transcriptionnelle (Bres et al., 2003) et il a récemment été montré qu'elle est capable de moduler l'ubiquitylation de protéines cellulaires (Col et al., 2005).

Puisque rien n'est encore connu concernant la régulation de Rev par de telles modifications, on peut se demander si Rev est modifiée par l'ubiquitine ou par SUMO dans la cellule, et dans ce cas quelles en sont les conséquences sur son activité. La compréhension de ces mécanismes dans le déroulement de la réplication virale pourrait permettre la modélisation de nouveaux inhibiteurs ayant pour cible une des étapes du processus de régulation des fonctions virales.

J'exposerai dans le paragraphe suivant le rôle de Tat dans l'infection par HIV-1, et comment elle utilise les systèmes de modifications cellulaires pour son activité. De la même manière, et puisque cette protéine fait l'objet de mon travail de thèse, je détaillerai la fonction de Rev et son rôle dans la réplication du HIV-1. Enfin, je montrerai quels sont les moyens qui ont été mis en œuvre pour empêcher l'action de ces deux protéines virales, et comment il serait possible d'inhiber leur fonction.

III. Mécanismes d'action et régulation des protéines Tat et Rev du HIV-1

L'expression de l'ensemble des gènes viraux à partir d'une seule entité génomique virale est hautement régulée par les deux protéines régulatrices Tat et Rev. En effet, il a rapidement été montré que ces deux protéines interagissent fonctionnellement pour moduler l'expression des gènes viraux, en contrôlant la quantité et le type d'ARNm viraux qui seront traduits durant les différentes phases du cycle viral (Knight et al., 1987 ; Malim et al., 1988). Ainsi, par sa fonction trans-activatrice sur le promoteur viral, Tat exerce une action positive sur l'expression de l'ensemble des gènes viraux. Rev permet quant à elle l'expression spécifique des gènes codant pour les protéines tardives, exerçant de ce fait un rétrocontrôle négatif sur la production des protéines régulatrices précoces, dont sa propre expression. De cette manière, Tat et Rev agissent comme de véritables régulateurs temporels de l'expression des gènes viraux et contrôlent de manière précise le déroulement du cycle viral.

III.1. La protéine Tat

La protéine Tat (*Transactivator of Transcription*) est une petite protéine nucléaire du virus HIV-1. C'est un transactivateur puissant de la transcription virale, essentiel pour l'expression de l'ensemble des gènes viraux, et intervenant également dans la pathogénèse du virus. En effet, Tat participe activement à l'expression de nombreux gènes cellulaires, en recrutant des facteurs et co-activateurs de la transcription et en participant au remodelage de la chromatine. L'étude fine des domaines fonctionnels de Tat ainsi que de ses modifications post-traductionnelles a permis d'identifier de nombreux facteurs interagissant avec cette protéine et de mieux comprendre son mécanisme d'action.

III.1.1. Domaines fonctionnels

Tat est une protéine de 101 acides aminés, exprimée à partir d'un cadre de lecture formé de deux exons, qui codent respectivement pour les résidus 1-72 et 73-101 de la protéine finale. Cette protéine est largement conservée parmi tous les isolats de virus, bien que l'on retrouve

parfois une forme tronquée de Tat, dont la séquence se termine prématurément au résidu 86. En effet, certaines souches virales (LAI, HXB2, pNL4-3) présentent une mutation d'un nucléotide, qui génère un codon de terminaison en position 87 (Neuveut and Jeang, 1996). Par ailleurs, durant la phase tardive du cycle viral, une autre forme tronquée, codée uniquement par le premier exon, est générée lorsque les ARNm viraux non épissés sont exportés au cytoplasme par la protéine virale Rev (Malim and Cullen, 1991). Cette forme de 72 acides aminés est suffisante pour trans-activer le promoteur viral. Cependant, les résidus codés par le second exon ont une importance biologique certaine puisqu'ils sont retrouvés chez la plupart des virus se répliquant *in vivo*.

Enfin, une étude récente a montré qu'une partie du pool de protéines Tat présentes dans la cellule infectée s'incorpore aux nouveaux virions, où Tat subit un clivage dans sa partie amino-terminale par la protéase virale. Cette forme tronquée de Tat semble suffisante voire nécessaire pour une transcription inverse efficace (Apolloni et al., 2003).

L'analyse fonctionnelle de Tat, notamment par la génération d'une collection de mutants ponctuels de la séquence initiale, a permis d'identifier plusieurs domaines essentiels à ses fonctions (**Figure 18**) (Ruben et al., 1989). Tat est ainsi formée de quatre régions principales dans l'exon 1 : une région amino-terminale acide (résidus 1 à 21), une région riche en cystéines (résidus 22 à 37), la région « cœur » (résidus 38 à 47), et la région carboxy-terminale basique (résidus 48 à 72). Les résidus du second exon de Tat (résidus 73 à 101) ont un rôle dans la répllication virale, dans l'activation du provirus ainsi que dans la pathogenèse du virus.

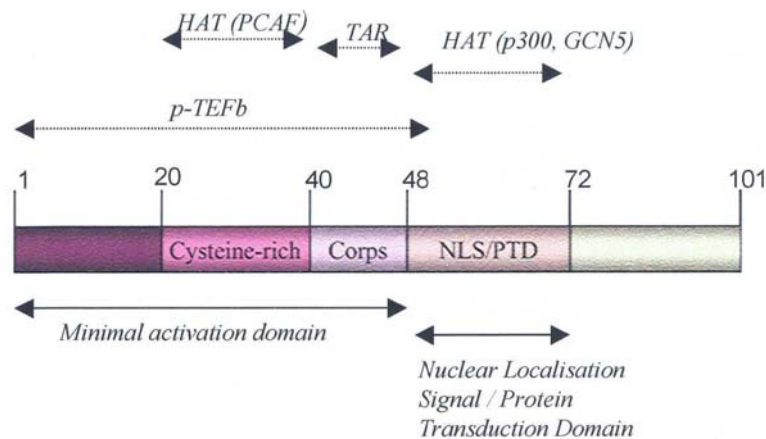


Figure 18: Domaines fonctionnels de la protéine Tat du HIV-1.

La séquence du premier exon de Tat (1-72) est divisée en 4 domaines principaux. Elle contient les domaines de liaison à l'ARN TAR et aux différents co-facteurs cellulaires de Tat, dont les acétyltransférases des histones (HAT) et le facteur p-TEFb. Tat possède également un domaine basique qui confère sa localisation nucléaire (NLS) et sa propriété de pénétration intracellulaire (PTD). Les 48 premiers acides aminés forment le site minimal nécessaire pour l'activité *trans*-activatrice de Tat sur la transcription. Le second exon de Tat (73-101) contient des résidus importants pour la pathogénicité du virus.

Une mutation dans les 20 premiers acides aminés de la séquence de Tat est bien tolérée, alors que la substitution d'une des 7 cystéines entre les positions 21 à 40 abolit sa fonction. Plusieurs auteurs ont ainsi défini un domaine d'activation ou domaine effecteur, constitué des résidus 1 à 47 (Carroll et al., 1991). Ce domaine permet l'interaction de Tat avec de nombreux facteurs et co-activateurs cellulaires de la transcription, et est donc essentiel à l'activité *trans*-activatrice de Tat.

La région 49-72 est certainement la plus étudiée. C'est une région riche en arginine (*Arginin Rich Motif*, ARM) qui contient un motif basique RKKRRQRRR (R=arginine, K=lysine) important pour la liaison de Tat sur l'ARN et pour sa localisation nucléaire (Dingwall et al., 1989). En effet, ces résidus basiques contribuent à l'association de Tat sur une séquence cible de l'ARNm viral, l'élément TAR (*Trans-activation responsive*), et font de Tat une véritable protéine de liaison à l'ARN (*RNA binding protein*, RBP) (Berkhout et al, 1989). Cet élément TAR forme une structure en tige-boucle en 5' des ARN naissants de la transcription à partir du LTR viral, et constitue le signal essentiel pour l'activation de la transcription par Tat. Il a été montré qu'il est possible de remplacer la région basique de Tat par celle de la protéine

virale Rev sans affecter la liaison à l'ARN et l'activité trans-activatrice de Tat (Subramanian et al., 1990). Toutefois, la spécificité de liaison Tat-TAR est également dictée par des résidus entourant le motif basique de Tat, qui augmentent l'affinité de la protéine pour l'ARN en établissant d'autres contacts avec l'élément TAR et en stabilisant le complexe ARN-protéine (Luo and Peterlin, 1993).

La région 49-72 constitue également un signal de localisation nucléaire (NLS), qui contribue à la localisation de Tat dans le noyau des cellules infectées où elle exerce sa fonction trans-activatrice (Modesti et al., 1991). Toutefois, des études ont montré que Tat effectue la navette entre le noyau et le cytoplasme, où elle intervient dans d'autres fonctions (Stauber and Pavlakis, 1998).

Il a également été découvert que le motif ARM permet à Tat de pénétrer dans les cellules de manière autonome, une propriété intrinsèque qu'elle partage avec de nombreuses autres protéines cellulaires ou virales (Frankel and Pabo, 1988). En effet, les résidus basiques du domaine ARM semblent permettre des interactions avec les lipides chargés négativement de la membrane cellulaire, ce qui faciliterait la pénétration de Tat. Cette propriété permet à Tat de traverser les membranes cellulaires pour pénétrer dans des cellules voisines non infectées et perturber leur fonctionnement. Ce domaine de pénétration, plus communément appelé domaine de transduction protéique ou PTD (*Protein Transduction Domain*), est désormais largement utilisé pour permettre la libération de molécules thérapeutiques diverses à l'intérieur de cellules cibles. Je reviendrai sur ce point dans la partie « Discussion » de ce manuscrit.

La séquence de Tat semble assez conservée parmi les différentes souches virales, et particulièrement au niveau de son domaine ARM et de la région riche en cystéines. Toutefois, il a récemment été montré qu'une substitution de la thréonine en position 23 par un résidu asparagine apparaît naturellement au cours de l'infection (Reza et al., 2003). Cette mutation renforce l'interaction de Tat avec l'un de ses partenaires cellulaires, p-TEFb, et augmente sa fonction trans-activatrice. Cette substitution semble contribuer à l'adaptation du virus à son environnement et favoriser sa résistance contre le système immunitaire de l'organisme hôte. Elle pourrait également contrebalancer l'effet délétère d'autres mutations internes à Tat ou sur d'autres séquences virales, qui apparaissent suite aux traitements antirétroviraux et qui peuvent être globalement défavorables à la réplication du virus.

III.1.2. Tat et la transcription du génome viral

Tat est l'unique transactivateur du HIV-1, qui se lie sur l'élément TAR, une séquence de 59 nucléotides qui se forme spontanément à l'extrémité 5' de tous les ARNm du virus (Berkhout et al., 1989). Cette interaction, conjointement avec le recrutement d'autres facteurs cellulaires, active fortement la transcription virale, qui peut être augmentée de plusieurs milliers de fois par la présence de Tat. Cette action trans-activatrice de Tat implique un déroulement de la transcription virale en deux phases, l'une précoce et basale non dépendante de Tat et l'autre plus tardive et active, dépendante de Tat.

Pour activer la transcription virale, Tat agit comme un adaptateur entre l'ARN viral et des protéines cellulaires impliquées dans la transcription des gènes de la cellule (**Figure 19**) (Rana and Jeang, 1999).

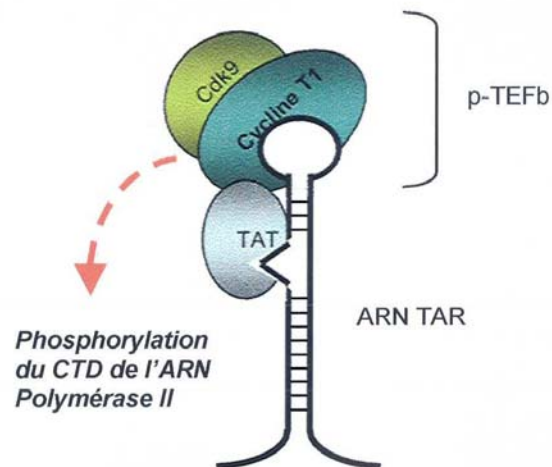


Figure 19 : Modèle de l'assemblage entre Tat et le complexe p-TEFb sur TAR.

Représentation schématique de l'élément de réponse à Tat sur l'ARN, le TAR, sur lequel se fixe la protéine virale Tat. Cette interaction permet le recrutement du complexe p-TEFb, constitué de l'hétérodimère Cycline T1-Cdk9, ce qui induit la phosphorylation de l'extrémité carboxy-terminale (CTD) de l'ARN polymérase II cellulaire.

En particulier, Tat interagit avec la cycline T1, un composant du facteur positif d'élongation de la transcription p-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor*), qui stimule la progression de l'ARN polymérase II cellulaire le long du génome viral et augmente la synthèse des ARNm viraux. En effet, en l'absence de Tat, l'ARN polymérase II est capable d'initier la transcription du LTR viral, mais de manière inefficace. Par sa liaison à la cycline T1, Tat recrute l'activité kinase de l'enzyme Cdk9 (*Cyclin-dependent kinase 9*), qui va induire la phosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II et ainsi augmenter sa processivité le long du génome viral. Par ailleurs, Tat recrute des co-activateurs de la transcription, dont p300/CBP (*CREB Binding Protein*) et PCAF (*p300/CBP associated factor*), ou encore Tip60 (*Tat-interacting protein 60*) (Jeang et al., 1999). Ces facteurs sont des acétylases des histones, qui induisent un remodelage de la chromatine et permettent l'accès de l'ARN polymérase II sur la séquence virale. De ce fait, Tat joue un rôle important sur la structure de la chromatine, dont la modification exerce un effet sur la transcription. Par ailleurs, p300 et PCAF peuvent directement acétyler Tat, ce qui lui permet d'établir des interactions stables avec l'ARN viral et/ou avec des facteurs cellulaires, pour promouvoir l'élongation de la transcription (Hetzer et al., 2005) (**Figure 20**)

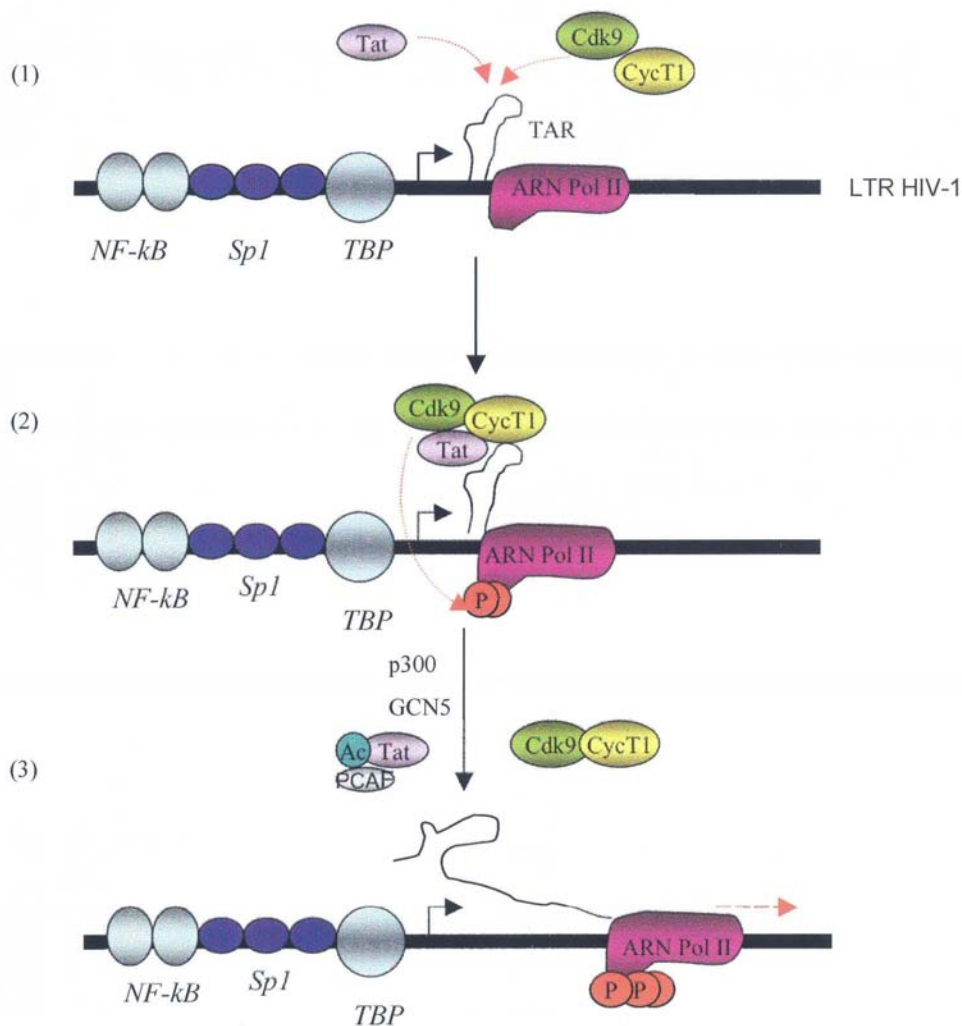


Figure 20 : Modèle de la *trans*-activation transcriptionnelle par Tat.

Le promoteur HIV-1 contient une série d'éléments de contrôle de la transcription, dont des sites de fixation pour des facteurs de transcription NF- κ B et Sp1, et la boîte TATA sur laquelle se lie TBP. (1) Tat interagit avec la séquence TAR de l'ARN naissant et s'associe avec le complexe p-TEFb, constitué de la cycline T1 et de la kinase Cdk9. (2) Cdk9 permet la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN Polymérase II cellulaire. (3) L'acétylation de Tat par p300 ou GCN5 lui permet de recruter PCAF, ce qui libère p-TEFb et Tat de l'élément TAR, et stimule l'élongation de la transcription.

Plusieurs auteurs ont montré que Tat joue également un rôle dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (Brady et al., 2005). En effet, le promoteur viral contient un ensemble d'éléments contrôlant la transcription, dont des sites de liaison à NF- κ B et à Sp1, la région TATA, le site d'initiation de la transcription et l'élément TAR. Pour initier la transcription, les activateurs de la transcription, dont NF- κ B et Sp1, se lient dans cette région du promoteur viral et interagissent avec des facteurs de transcription comme TBP (*TATA box*

binding protein), TFIIF (*Transcription Factor IIF*), p-TEFb et l'ARN polymérase II. Des tests d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que Tat interagit directement avec TBP, mais que les partenaires de TBP pour la transcription des gènes cellulaires, les protéines TAFs (*TBP-associated factors*), ne sont pas présents dans les complexes de transcription virale (Raha et al., 2005). L'interaction entre p-TEFb et Tat semble donc faciliter la liaison de TBP au niveau du complexe présent sur le promoteur viral, induisant le recrutement d'autres acteurs de la transcription et la formation d'un complexe de pré-initiation stable pour initier la transcription. A ce stade, le CTD de l'ARN polymérase II est phosphorylé par TFIIF. Par la suite, la fixation de Tat et p-TEFb sur TAR provoque l'hyperphosphorylation du CTD ainsi que d'autres facteurs, pour promouvoir l'élongation de la transcription (**Figure 21**).

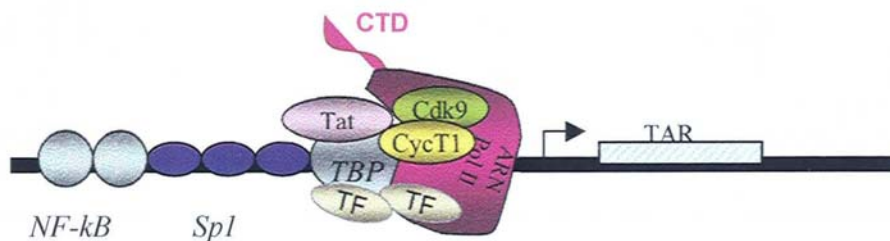


Figure 21 : Rôle de Tat dans l'initiation de la transcription.

Plusieurs travaux montrent un rôle de Tat dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription au niveau du promoteur viral, selon le modèle représenté ci-dessus. L'interaction entre Tat et l'hétérodimère Cycline T1-Cdk9 facilite le recrutement de la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) et d'autres facteurs de transcription cellulaires (TF) pour former un complexe fonctionnel qui initie la transcription.

Tat est également capable de moduler la transcription à partir de promoteurs cellulaires, indépendamment de l'élément TAR. En particulier, elle régule l'expression des molécules du CMH-I et de cytokines inflammatoires, ce qui permet au virus de contrôler les réponses immunitaires déclenchées à son égard (Buonaguro et al., 1992 ; Howcroft et al., 1993). En effet, Tat peut stimuler l'activité de la protéine kinase PKR, qui phosphoryle I κ -B et provoque sa dégradation. NF- κ B peut alors atteindre le noyau et activer l'expression de gènes spécifiques (McMillan et al., 1995 ; Marcello et al., 2001).

III.1.3. Autres fonctions de Tat

Outre sa fonction sur la transcription virale, Tat possède d'autres activités et joue notamment un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire suite à l'infection virale. En effet, Tat est activement sécrétée par les cellules infectées, et le taux de protéines présentes dans les compartiments extracellulaires peut rapidement atteindre des valeurs significatives, proches de celles de médiateurs de la réponse immunitaire. Par exemple, la concentration de Tat retrouvée dans le sérum des patients peut atteindre 1 ng/ml, à l'image de la concentration en chimiokines. Tat peut également provenir de cellules infectées détruites et qui ont libéré leur contenu, y compris les composants viraux. Cette protéine virale ainsi libérée dans le milieu extracellulaire est capable de pénétrer dans différents types cellulaires encore non touchés par l'infection, et de moduler leur fonctionnement pour renforcer l'action délétère de l'infection virale.

a) Modulation de la réponse immunitaire

L'infection par HIV-1 est caractérisée par une hyperactivation chronique des cellules T de l'hôte pour maintenir une infectivité optimale du virus qui ne peut pas infecter les cellules T non activées. Tat joue ainsi un rôle dans l'activation des cellules quiescentes en stimulant la sécrétion de certaines interleukines. En effet, Tat affecte la transcription de gènes cellulaires spécifiques des cellules T, en induisant l'activation de facteurs de transcription. L'infection par HIV-1 est donc associée à une réponse accrue des cellules T aux signaux stimulateurs activant la synthèse d'interleukines, comme l'IL-2 (Ott et al., 1997) ou le facteur de nécrose de tumeur TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Buonaguro et al., 1992.), qui sont impliqués dans l'activation des réponses immunitaires. Par ailleurs, cette action stimulatrice de Tat dépend des 29 acides aminés codés par le second exon de la séquence Tat, ce qui confirme l'importance biologique des résidus 73 à 101 de la protéine Tat (Ott et al., 1997).

Tat contribue également à l'échappement du virus à la réponse immunitaire, puisqu'elle participe au blocage de la présentation des peptides viraux antigéniques à la surface des cellules. En effet, il a été montré que Tat interagit directement avec certaines sous-unités du protéasome 26S et affecte son activité protéolytique (Apcher et al., 2003). Tat inhibe ainsi l'activité de protéolyse du protéasome en se liant avec six de ses sous unités β , empêchant la dégradation des molécules antigéniques. Tat interfère également avec la liaison du régulateur

PA28 sur les sous unités $\alpha 4$ et $\alpha 7$ du complexe hybride 19S-20S-PA28 (ou immunoprotéasome), impliqué dans la présentation antigénique via le MHC-I (Apcher et al., 2003).

Tat possède également des propriétés rappelant celles des chimiokines (Albini et al., 1998). Celles-ci forment une large catégorie de la famille des cytokines, et possèdent des propriétés chimio-attractives pour certains types cellulaires. Ce sont des ligands pour des récepteurs transmembranaires présents à la surface des monocytes et des macrophages, dont les récepteurs CXCR4 et CCR5 impliqués dans l'infection par le HIV-1, ou encore CCR2 et CCR3. Des auteurs ont montré des similarités de séquences entre Tat et certaines chimiokines, au niveau de résidus essentiels à leur fonction (Albini et al., 1998). En particulier, Tat possède un motif CCF (Cys-Cys-Phe) ainsi qu'un motif SYXR (Ser-Tyr-X-Arg), qui est un déterminant de la sélectivité cellulaire des chimiokines. Ainsi, Tat présente de fortes similarités avec la famille des MCP (*Monocyte Chemoattractant Protein*), ainsi qu'avec RANTES. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré qu'un peptide synthétique formé de la région riche en cystéines et du domaine cœur de Tat (Cys_{L24-51}) possède les mêmes propriétés chimio-attractives que la protéine Tat entière. Ce peptide contient le motif CCF, qui est une étiquette très conservée chez les chimiokines β . Ainsi, Tat partage certains récepteurs spécifiques aux chimiokines, et est capable de déplacer de manière compétitive les ligands des récepteurs CCR2 et CCR3. Tat apparaît donc comme une molécule « mimétique », mimant l'action des chimiokines pour recruter les monocytes et les macrophages vers les sites d'infection et faciliter la dissémination du virus.

b) Apoptose des cellules non infectées

Une fois dans le milieu intracellulaire de cellules non infectées, Tat provoque différents événements nucléaires et cytoplasmiques responsables de la mort cellulaire programmée. Ainsi, Tat joue un rôle prépondérant dans la diminution progressive mais irrémédiable des certains types cellulaires de l'organisme. En particulier, la déplétion du pool de lymphocytes T est à l'origine de la détérioration des fonctions immunitaires de l'hôte, et la mort massive des cellules du système nerveux central entraîne des pathologies sérieuses comme la démence ou l'encéphalite associées à HIV (King et al., 2006).

Il a été montré que Tat agit comme un signal apoptotique pour certaines lignées cellulaires, et en particulier les lymphocytes T quiescents présents dans le sang et les tissus lymphoïdes (Li et al., 1995a). En effet, des cellules T d'une lignée surexprimant la protéine Tat montrent des changements morphologiques typiques de l'apoptose : condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN et formation de corps apoptotiques. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré que Tat est associée à une augmentation de l'activité des kinases Cdk, impliquées dans la progression du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose. Ainsi, Tat serait excrétée des cellules infectées et activerait les kinases Cdk de cellules T voisines non infectées, pour les conduire à l'apoptose.

La forte déplétion en cellules T semble également s'expliquer par l'action de Tat dans la modulation de la voie NF- κ B. Il a en effet été proposé que le TNF est activement exprimé dans les cellules nouvellement infectées par le HIV-1. Celui-ci stimule alors la réplication virale et la production de Tat via l'activation de la voie NF- κ B (Westendorp et al., 1995). En effet, le TNF stimule l'activité de NF- κ B en permettant sa translocation nucléaire. Par cette fonction, le TNF intervient dans l'activation de la réplication du HIV-1 dans les cellules infectées, en permettant la liaison du facteur de transcription NF- κ B sur le promoteur viral. Tat est alors produite puis sécrétée, et peut induire un stress oxydant dans les cellules voisines en inhibant l'expression de la dismutase superoxyde. L'absence d'activité de cette enzyme mitochondriale impliquée dans les réponses cellulaires à un stress oxydant provoque une altération de l'état redox de la cellule, qui augmente la susceptibilité des cellules à l'action cytotoxique du TNF et entraîne leur destruction. Ainsi, l'action synergique de Tat et du TNF conduit à la progression rapide de l'infection en déplaçant progressivement les cellules du système immunitaire.

Une étude plus récente a montré que Tat pénètre dans les monocytes sanguins et augmente l'expression et la sécrétion du facteur TRAIL (*TNF-related apoptosis-induced ligand*) (Yang et al., 2003). TRAIL est un membre de la superfamille du TNF, impliqué dans la mort cellulaire programmée. C'est une molécule hautement toxique pour les cellules T lorsqu'elle est sécrétée dans les compartiments extracellulaires, et qui induit alors leur élimination sélective.

Tat semble également capable d'induire l'apoptose des cellules en déstabilisant leur cytosquelette et en provoquant l'activation de facteurs de la voie apoptotique mitochondriale

(Chen et al., 2002). En effet, Tat peut se fixer directement sur les microtubules et altérer la dynamique du réseau tubulaire de la cellule. Cette interaction provoque la libération de facteurs pro-apoptotiques, autrement séquestrés dans le cytosquelette, dont le facteur Bim. Bim induit la voie apoptotique mitochondriale en antagonisant l'action du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Ces facteurs mitochondriaux jouent un rôle essentiel dans l'apoptose, en permettant la libération de facteurs apoptogènes dont le cytochrome c, qui recrute et active une des caspases majeures de la voie apoptotique, la caspase 9 (Cory et al., 2003).

Par ailleurs, il a été montré que Tat stimule l'expression du ligand FasL, impliqué dans le déclenchement de l'apoptose, et qu'elle induit le clivage de la caspase 8, une autre caspase de la voie apoptotique (Campbell et al., 2005).

Il a également été montré que Tat est capable de fixer des facteurs présents dans le milieu extracellulaire, pour moduler leur activité et perturber le fonctionnement des cellules. Par exemple, Tat se fixe sur les facteurs de croissance épithéliaux (épithéline/granuline), également exprimés dans les lymphocytes et les monocytes (Trinh et al., 1999). Ces facteurs de croissance contribuent au bon fonctionnement du système immunitaire, et leur détournement par Tat pourrait jouer un rôle dans la destruction de l'architecture des organes lymphoïdes et des cellules immunitaires.

Cependant, il est important de noter que les cellules infectées par le HIV-1, et produisant activement la protéine Tat, sont résistantes à l'apoptose induite par Tat. En effet, des expériences de co-cultures de cellules infectées et non infectées ont montré que seules les cellules non infectées meurent par apoptose (Nardelli et al. 1995). Cela suppose que le virus a développé des stratégies pour empêcher le déclenchement du programme de mort dans les cellules qu'il infecte. En particulier, il semble que plusieurs de ses protéines virales contrôlent directement l'activité de certains acteurs de l'apoptose. Ainsi, Nef serait capable d'inactiver le facteur pro-apoptotique Bad et Vpr semble réguler les facteurs anti-apoptotique Bcl-2 et pro-apoptotique Bax (Campbell et al., 2006).

c) Tat et la pathogénèse du HIV-1

Nous avons vu que Tat est fortement impliquée dans la modulation des réponses immunitaires de l'hôte infecté, en recrutant les acteurs clés de l'immunité et en activant les processus de destruction cellulaire. Tat est donc un médiateur important des réponses inflammatoires suite à l'infection par HIV-1, et est en partie responsable des désordres immunitaires rencontrés

chez les patients atteints du SIDA. Tat contribue en effet à la destruction des défenses immunitaires de l'organisme infecté, et favorise le développement de cancers (Li et al., 1995b ; Lee et al., 2005). Par ailleurs, l'action de Tat sur les cellules du système nerveux central (SNC) implique sa participation dans la dégénération neuronale et les pathologies du SNC associées au syndrome du SIDA, puisqu'elle entraîne notamment un dérèglement des astrocytes et la mort des neurones (Zhou et al., 2004 ; King et al., 2006).

L'infection par le HIV-1 est associée à un risque accru de développer des cancers dont les sarcomes de Kaposi. On sait maintenant que Tat contribue au développement de tumeurs, souvent rencontrées chez les patients infectés. En particulier, des auteurs ont montré une modulation réciproque entre Tat et la protéine p53, relation importante pour la pathogenèse du virus (Li et al., 1995b). En effet, Tat est capable de bloquer la transcription de p53, et inversement p53 peut bloquer la fonction *trans*-activatrice de Tat. Ainsi, l'activation du LTR médiée par Tat est fortement inhibée en présence de p53, qui semble pouvoir maintenir le virus dans un état de latence dans les cellules infectées. Sous l'action de stimuli externes, comme des cytokines ou une infection bactérienne, la réplication virale est activée, provoquant l'accumulation de Tat dans la cellule. Celle-ci va alors inhiber la transcription de p53, entraînant une réplication virale intense associée à l'accumulation d'aberrations chromosomiques dans les cellules responsables du développement de tumeurs.

Des auteurs ont également montré un rôle de Tat dans le développement du cancer du sein chez des patients infectés par HIV-1 (Lee et al., 2005). En effet, il a été montré que dans des cellules mammaires tumorales humaines, Tat augmente l'activité du facteur de transcription NF- κ B, en stimulant sa liaison sur les promoteurs des gènes cellulaires codant pour l'IL-6 et l'IL-8. Ces deux interleukines sont des médiateurs importants des réponses immunitaires et inflammatoires, qui contribuent notamment au développement de tumeurs. Par ailleurs, Tat stimule l'expression de certaines métalloprotéinases, des enzymes provoquant la dégradation de la matrice extracellulaire. En induisant l'expression de ces différents facteurs, Tat crée un environnement pro-inflammatoire favorable au développement de métastases.

Enfin, Tat est indubitablement à l'origine de pathologies du SNC, puisqu'elle induit un dérèglement profond des cellules nerveuses (King et al., 2006). En effet, elle est capable de pénétrer dans différents types de cellules nerveuses, comme les astrocytes, les neurones et les

cellules microgliales, et entraîne des processus d'inflammation et/ou d'apoptose, responsables de pathologies comme la démence ou l'encéphalite associées à HIV.

III.1.4. Régulation de la fonction Tat par des modifications post-traductionnelles

La fonction activatrice de Tat sur la transcription virale implique son interaction avec l'ARN viral et le recrutement de nombreux facteurs cellulaires, dans un ordre bien précis pour permettre une transcription efficace du génome viral. La dynamique et la spécificité de ces interactions sont régulées par un ensemble de modifications post-traductionnelles dont Tat est la cible. Ces modifications permettent en effet à Tat de recruter des partenaires cellulaires spécifiques à un temps donné, pour stimuler la transcription (**Figure 22**).

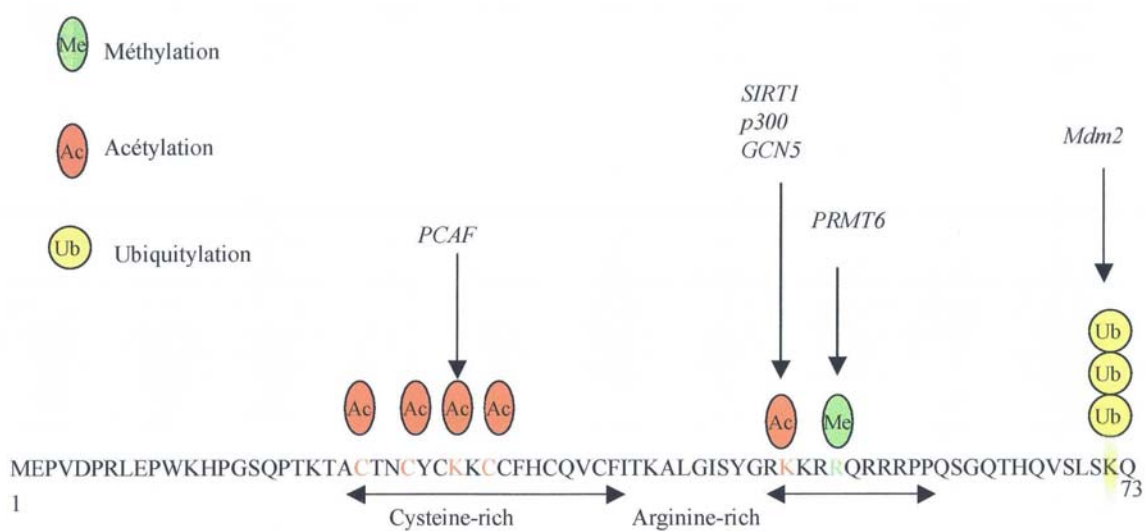


Figure 22 : Modifications post-traductionnelles de la protéine Tat du HIV-1.

Seule la séquence peptidique du premier exon de Tat est représentée. Les cystéines du domaine riche en cystéine peuvent être acétylées en présence d'acétyl co-enzyme A. La lysine 28 de ce domaine est acétylée par PCAF, ce qui crée un site de liaison pour le bromodomaine de ce même facteur. Les lysines 50 et 51 dans la région riche en arginines peuvent être acétylées par p300 et GCN5, entraînant la dissociation de Tat de l'élément TAR et le recrutement du complexe de l'ARN polymérase II, pour l'élongation de la transcription. La lysine 50 peut être la cible de la désacétylase SIRT1, pour réguler l'activité de Tat. L'arginine 53 peut être diméthylée par l'enzyme PRMT6, ce qui provoque probablement la dissociation de PCAF de Tat. La protéine Mdm2 induit l'ubiquitylation de Tat via la lysine 71, et participe ainsi à l'activation de la fonction Tat.

L'acétylation de Tat est une modification essentielle à sa liaison avec les complexes cellulaires de la transcription. Trois résidus lysine sont la cible d'une acétylase : la lysine 28, située dans la partie riche en cystéines (domaine d'activation), qui est acétylée par le facteur PCAF ; et les lysines 50 et 51 du domaine riche en arginine, qui sont modifiées par p300 et hGCN5 (Col et al., 2001). La mutation de la lysine 28 entraîne une réplication virale défectueuse et réduit les interactions de Tat avec la cycline T1 et le facteur PCAF (Bres et al., 2002). En effet, l'acétylation de la lysine 28 de Tat augmente son affinité pour l'élément TAR et pour p-TEFb, entraînant la formation d'un complexe ternaire Tat/p-TEFb/TAR qui stimule la processivité de l'ARN polymérase II. Tat est ensuite acétylé sur la lysine 50, ce qui modifie l'affinité du domaine ARM pour l'ARN. Tat se détache alors de l'élément TAR et de p-TEFb pour se fixer avec une très forte affinité à l'ARN polymérase II et à PCAF (Hetzer et al., 2005). En effet, le bromodomaine de PCAF se fixe sur Tat acétylé, en compétition avec TAR (Mujtaba et al., 2002). L'activité acétylase de PCAF contribue également à l'hyperacétylation de Tat et d'autres facteurs comme nuc-1 (*single nucleosome*) présents sur la chromatine, pour promouvoir une élongation efficace de la transcription.

L'acétylation multiple de Tat semble expliquer en partie son rôle à la fois dans la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase et dans la réorganisation de la chromatine. Par ailleurs, cette acétylation suggère une régulation de la transcription virale en deux phases. Ainsi, Tat non acétylé régulerait la phase précoce de la transcription, dépendante de la cycline T1 et de TAR pour la phosphorylation de la polymérase, alors que Tat acétylé dirigerait la phase tardive de la transcription virale, dépendante de PCAF pour la processivité de la polymérase sur la chromatine.

La lysine 50 de Tat peut être désacétylée par la sirtuine 1 (SIRT1), une désacétylase cellulaire qui nécessite la présence d'un co-facteur, le NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) (Hetzer et al., 2005). Cette relation entre Tat et la sirtuine 1 corrobore l'idée d'une connexion entre la transcription virale et l'état métabolique de la cellule. En effet, un changement du rapport entre les formes oxydées et réduites NAD⁺/NADH, dans des conditions de stress par exemple, pourrait réguler l'activité de Tat via celle de la sirtuine 1.

La méthylation de Tat sur des résidus arginine de son domaine ARM semble permettre le recyclage de la protéine, en la libérant du complexe de l'ARN polymérase II et de PCAF à la fin du cycle de transcription. En effet, il a été montré que la protéine PRMT6 (*Protein arginine(R) methyltransferase*) a comme substrat spécifique Tat *in vitro* et *in vivo*, et qu'elle

peut provoquer la méthylation d'un ou plusieurs résidus arginine de Tat (Boulanger et al., 2005). La proximité des résidus méthylés et de la lysine 50 suggère que la méthylation peut moduler l'acétylation de cette lysine, et inversement. Par ailleurs, l'arginine 53 est directement impliquée dans l'association de Tat avec le bromodomaine de PCAF (Mutjaba et al., 2002). La méthylation de cette arginine pourrait donc être à l'origine de la dissociation de Tat et PCAF. La diméthylation de Tat est irréversible, et pourrait marquer la protéine virale pour la dégradation (Hetzer et al., 2005).

L'ubiquitylation est une modification de Tat récemment identifiée. En effet, il a été montré que la proto-oncoprotéine Hdm2 (*Human double minute*), qui ubiquityle p53, interagit avec Tat et provoque la polyubiquitylation d'une fraction des protéines Tat *in vitro* et *in vivo* (Bres et al., 2003). La lysine 71 est la cible majeure pour l'ubiquitylation de Tat, mais il n'est pas exclu que d'autres lysines soient également ubiquitylées. La mutation de la lysine 71 en arginine réduit l'activité de Tat, alors que la fusion de l'ubiquitine sur ce mutant restaure la fonction transcriptionnelle. Par ailleurs, la surexpression de Hdm2 n'affecte pas la stabilité de Tat, indiquant clairement que l'ubiquitine n'a pas un rôle protéolytique sur la protéine. Au contraire, l'ubiquitine participe à l'activité transcriptionnelle de Tat, bien que le mécanisme de cette activation ne soit pas encore défini. Une possibilité est que l'ubiquitine active Tat sur le promoteur viral, peut-être en contribuant à son interaction avec la cycline T1. Une hypothèse a également été proposée, qui stipule que l'ubiquitine reconnaît Tat à la fin du cycle de transcription, pour provoquer sa destruction (Hetzer et al., 2005). Par ailleurs, la coiffe 19S du protéasome fixe des protéines ubiquitylées, et joue un rôle dans l'élongation de la transcription, probablement en tant que chaperon pour le déroulement des protéines. L'ubiquitylation de Tat pourrait permettre de recruter les particules 19S sur le promoteur viral.

Enfin, l'ubiquitine pourrait également permettre le recrutement de Tat dans les virions, où Tat peut être clivée par la protéase du HIV-1 (Appoloni et al., 2003).

La phosphorylation de Tat par la kinase cellulaire associée, Cdk9, a été décrite uniquement pour la protéine Tat du HIV de type 2 (Tat-2) (Herrmann et al., 1993). Le rôle de la phosphorylation dans la fonction de Tat-2 reste une énigme, mais il est possible qu'elle régule l'interaction de Tat-2 avec l'ARN, puisque les sites de phosphorylation de Tat-2, les thréonines 85 et 89 et la sérine 94, se situent dans son domaine ARM, qui comprend les résidus 78 à 90 (Yang et al., 1996).

III.1.5. Inhibition de la fonction Tat

La transcription des gènes du HIV-1 est une étape essentielle du cycle viral, par conséquent considérée comme l'une des cibles possibles pour inhiber la réplication du virus. L'expression des gènes viraux est, comme nous l'avons vu, hautement régulée par la protéine Tat, qui joue un rôle central dans la stimulation de l'activité transcriptionnelle virale, en faisant intervenir un ensemble de partenaires cellulaires. De nombreux travaux cherchent à modéliser des inhibiteurs sélectifs de cette étape de transcription en ciblant la fonction Tat, et particulièrement pour empêcher sa liaison à l'élément TAR. Je citerai ci-dessous quelques unes des stratégies parmi tout l'arsenal utilisé pour inhiber la fonction de cette protéine virale. Plusieurs molécules ont été proposées pour empêcher l'interaction de Tat avec l'élément TAR. En particulier, de petites séquences ARN correspondant à la séquence TAR ont été utilisées pour détourner Tat de ses véritables cibles virales (Graham and Maio, 1990 ; Lee et al., 1995). Ces molécules, appelées « TAR decoy », entrent en compétition avec les séquences TAR virales pour la liaison à Tat, et bloquent alors sa fonction trans-activatrice. Elles semblent très efficaces pour inhiber la réplication virale, notamment lorsque elles sont fusionnées à une séquence qui les dirige exclusivement vers les nucléoles (Michienzi et al., 2002). En effet, la fusion de la molécule avec la séquence d'un petit ARN nucléolaire comme U16 provoque son accumulation dans les nucléoles. Ainsi, en séquestrant Tat dans les nucléoles, ces composés bloquent la transcription de l'ensemble des gènes viraux, induisant alors une inhibition efficace de la réplication virale. Cependant, l'utilisation de molécules ARN est confrontée à des problèmes d'instabilité et de délivrance intracellulaire, impliquant des doses élevées généralement incompatibles avec une bonne thérapie. Des auteurs ont proposé de produire des séquences TAR répétées en tandem afin de les délivrer dans la cellule, au risque cependant d'augmenter leur immunogénicité (Graham and Maio, 1990).

Une autre stratégie se base sur l'activité catalytique de séquences ARN, qui sont capables de cliver spécifiquement des molécules ribonucléotidiques en présence de magnésium : les ribozymes. Ce type de molécules est naturellement utilisé par de nombreux virus pathogènes des plantes et par des ARN satellites durant leur cycle de réplication. Ces ribozymes clivent les liaisons phosphodiester en amont des triplets GUX, où X peut être C, U, ou A, GUC étant la séquence la plus efficacement reconnue. Cette propriété fait des ribozymes un excellent moyen d'inactiver l'expression de gènes, et de bons candidats comme agent thérapeutique (Michienzi et al., 1998).

Des auteurs ont ainsi dirigé des ribozymes contre la séquence TAR et ont obtenu une inhibition spécifique de la fonction Tat, provoquant la diminution de la réplication virale (Chakraborti et al., 2003 ; Unwalla et al., 2006). Etant donné la grande conservation de la séquence TAR parmi les isolats de HIV-1, les ribozymes offrent une stratégie attractive en termes de spécificité et d'efficacité. Par ailleurs, empêcher l'action de Tat réduit de manière globale l'expression du virus, ce qui peut également ralentir l'émergence de virus résistants.

D'autres composés, qui bloquent l'activité kinase du complexe cyclineT1/Cdk9 ont été étudiés (Pumfery et al., 2006). En effet, plusieurs inhibiteurs des kinases dépendantes de cycline comme Cdk9 ou Cdk2, utilisés dans les traitements anticancéreux, se sont révélés efficaces contre la réplication du HIV-1. Parmi ceux-ci peut être cité le flavopiridol. Cependant, il est évident que cibler de telles enzymes cellulaires provoquera des effets délétères pour les cellules, et l'usage en thérapeutique de ce type d'agent conduira à un risque accru d'effets secondaires lourds.

Il est possible également de séquestrer Tat avant qu'elle ne s'associe à l'élément TAR, en utilisant des chaînes variables d'anticorps dirigés contre la protéine virale (Mhashilkar et al., 1995). Ces molécules scFv (*single-chain variable antibody fragments*) reconnaissent spécifiquement Tat, et l'empêchent d'exercer sa fonction sur la transcription virale dans le noyau, ce qui inhibe de manière efficace la réplication virale et rend les cellules résistantes à l'infection. D'autres auteurs ont récemment tiré parti de la séquence de pénétration de Tat, le PTD, pour permettre la libération de scFv dans le noyau (Theisen et al., 2006). De cette manière, la molécule chimère accède facilement au noyau et peut entrer en compétition avec TAR et probablement avec la cycline T1 pour la liaison à Tat. En effet, le PTD, par son caractère basique, est capable de fixer des acides nucléiques et peut donc se lier à TAR. Le fragment scFv, en se liant sur Tat, semble intervenir sur l'interaction Tat-Cycline T1. L'addition des effets des deux molécules formant la chimère conduit à une inhibition forte de Tat et de la réplication virale.

Une stratégie similaire a utilisé des chaînes d'anticorps dirigés contre le domaine de la cycline T1 qui interagit avec Tat (Bai et al., 2003). Ces molécules ciblent ainsi spécifiquement l'interaction entre Tat et la cycline T1, et permettent d'inhiber la réplication virale sans affecter la transcription des gènes cellulaires.

Une stratégie plus récente utilise l'ARN interférence (RNAi) pour supprimer efficacement la réplication virale. La RNAi est un processus d'extinction de gène, conservé et opérationnel chez les insectes, les nématodes, les plantes et les cellules mammifères. Il est initié par l'introduction ou l'expression de séquences ARN double brin (*double-stranded RNA*, dsRNA) homologues à une séquence du gène à supprimer, et qui provoque généralement l'inactivation post-transcriptionnelle spécifique de ce gène. Chez les plantes, ces ARN peuvent également provoquer la méthylation du promoteur du gène cible, dont l'expression sera alors éteinte (Mette et al., 2000). Chez les plantes et la Drosophile, cet ARN double brin est clivé par la RNase cellulaire appelée « Dicer » en siRNA (*small interfering RNA*) plus petits, qui sont les véritables médiateurs de la RNAi. Chez les mammifères, outre la dégradation des séquences ARN spécifiques, ces longs dsRNA peuvent induire des réponses cellulaires et provoquer l'inhibition globale et non spécifique de l'expression des gènes (Hannon and Rossi, 2004). En particulier, il est maintenant bien établi que la transfection de dsRNA provoque la liaison et l'activation de la protéine kinase R, ce qui entraîne la stimulation de la voie de réponse à l'interféron (Sledz et al., 2003). Toutefois, l'introduction directe dans des cellules de mammifères de siRNA synthétiques d'une vingtaine de nucléotides peut induire l'inactivation spécifique d'un gène cible, pouvant réduire jusqu'à 90% de la protéine correspondante dans la cellule, sans affecter les autres gènes. Cette technique est désormais largement employée pour déterminer les fonctions de nombreuses protéines cellulaires. Dans le cadre du HIV-1, la RNAi permet de mieux appréhender le rôle de chacune de protéines virales et cellulaires impliquées dans la réplication du virus.

Dans le cas particulier de Tat, plusieurs travaux ont montré qu'il est possible d'inhiber spécifiquement son expression par la technique de RNAi. Un groupe a synthétisé des siRNA spécifiques de la séquence codant uniquement pour Tat, provoquant la suppression sélective de sa fonction dans la cellule (Coburn and Cullen, 2002). Par ailleurs, l'inhibition similaire de l'expression de la protéine Rev provoque l'inhibition de la réplication virale dans des cellules T primaires ou immortalisées. En effet, ces couples de siRNA réduisent l'expression des trois catégories d'ARNm viraux, et semblent initier la dégradation de l'ARN génomique avant même l'étape de transcription inverse.

D'autres auteurs ont également montré que de multiples régions de la séquence codant pour Tat peuvent être ciblées par la RNAi, pour supprimer efficacement l'expression de la protéine dans des cellules infectées (Surabhi and Gaynor, 2002). De cette manière, l'inhibition de la

réplication virale est très efficace, et perdure pendant toute la durée de l'étude (2 semaines). L'infection de cellules préalablement transfectées avec les siRNA dirigés contre Tat est affectée de la même manière, et la réplication virale y est efficacement réprimée. Il semble donc possible de protéger les cellules d'une infection virale en exprimant constitutivement des siRNA spécifiques de régions très conservées du génome viral. L'utilisation de cette technique semble d'autant plus attractive pour Tat que sa séquence est très conservée et peu sujette aux variations. Par ailleurs, ces auteurs ont montré qu'il est possible de cibler plusieurs gènes viraux par RNAi pour inhiber efficacement la réplication virale. En effet, la suppression à la fois du gène *tat* et du gène codant pour la transcriptase inverse provoque l'inhibition de l'expression des ARNm viraux non épissés et épissés.

L'effet de la RNAi à long terme a été examiné sur une lignée de cellules T humaines exprimant stablement des shRNA (*short hairpin RNA*) dirigés contre la séquence *tat* (Boden et al., 2003). Les auteurs ont ainsi constaté une perte de l'activité antivirale des shRNA 25 jours après infection, alors que la production de ces shRNA se poursuit correctement dans les cellules. L'analyse des séquences de l'ARN viral produit lors des cycles de multiplication a révélé l'émergence d'une mutation ponctuelle dans la séquence *tat*, démontrant ainsi les limites de la méthode de RNAi pour une thérapie antirétrovirale. Une RNAi efficace devra donc cibler des régions très conservées des séquences virales (comme les séquences *gag* et *pol*), ou cibler simultanément différentes régions du génome du virus, pour réduire la probabilité de générer des mutants. Plusieurs tentatives ont été réalisées, en utilisant une combinaison de siRNA dirigés contre des séquences virales conservées, notamment au niveau des régions codant pour gp41, Tat, Rev et Nef (Jacque et al., 2002 ; Dave and Pomerantz, 2004). Ces siRNA interviennent très tôt dans le cycle de réplication virale, en dégradant l'ARN génomique avant même l'étape de transcription inverse et d'intégration. Ils semblent également pouvoir intervenir après la transcription, et dégrader les ARNm viraux correspondant aux régions ciblées, altérant ainsi la stœchiométrie des composants viraux. Cette stœchiométrie aberrante empêche l'assemblage des particules virales à la membrane cellulaire, et réduit l'infectivité des virions nouvellement produits.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont regardé l'effet de la suppression d'un acteur cellulaire de la réplication virale ou de la réponse à l'infection virale. Parmi eux, le facteur NF- κ B a été ciblé, mais sa suppression inhibe également l'expression de gènes cellulaires, ce qui entraîne des effets dramatiques sur les réponses immunitaires de la cellule (Surabhi and Gaynor,

2002). De la même manière, la RNAi contre les récepteurs aux chimiokines comme CCR5 est possible, mais évidemment délétère pour les fonctions immunitaires de l'hôte.

La liste des stratégies thérapeutiques développées pour empêcher la fonction de cet acteur viral principal dans la réplication du virus est encore longue, et elle ne cesse de croître. Cependant, il est évident que l'approche la plus appropriée se devra de cibler plusieurs fonctions virales, afin de bloquer la multiplication du HIV-1 à différentes étapes de son cycle de réplication, et de limiter l'émergence de virus résistants.

III.2. La protéine Rev

L'étude de l'organisation spécifique du génome des Rétrovirus a rapidement soulevé la question de comment de multiples gènes peuvent être exprimés à partir d'une seule entité virale. Ces virus sont en effet capables d'utiliser des facteurs de la cellule pour l'épissage alternatif de leur transcrite initial, et produisent ainsi une grande variété d'ARNm viraux. Dans le cas du HIV-1, plus de 30 espèces d'ARNm viraux coexistent dans une cellule infectée, mettant en jeu au moins 4 sites d'épissage différents en 5' de l'ARNm et 8 sites en 3' (Guatelli et al., 1990) (**Figure 23**). L'utilisation successive et régulée de ces différents sites permet la production séquentielle des différentes protéines virales, et explique l'émergence de nombreux transcrits contenant encore un ou plusieurs introns. De tels types d'ARNm cellulaires sont, dans les conditions normales de la cellule, retenus dans le noyau pour l'achèvement de leur épissage ou seront dégradés. Les processus d'épissage semblent par ailleurs exercer un effet positif sur l'export des ARNm cellulaires, qui ne sortent du noyau qu'une fois complètement maturés.

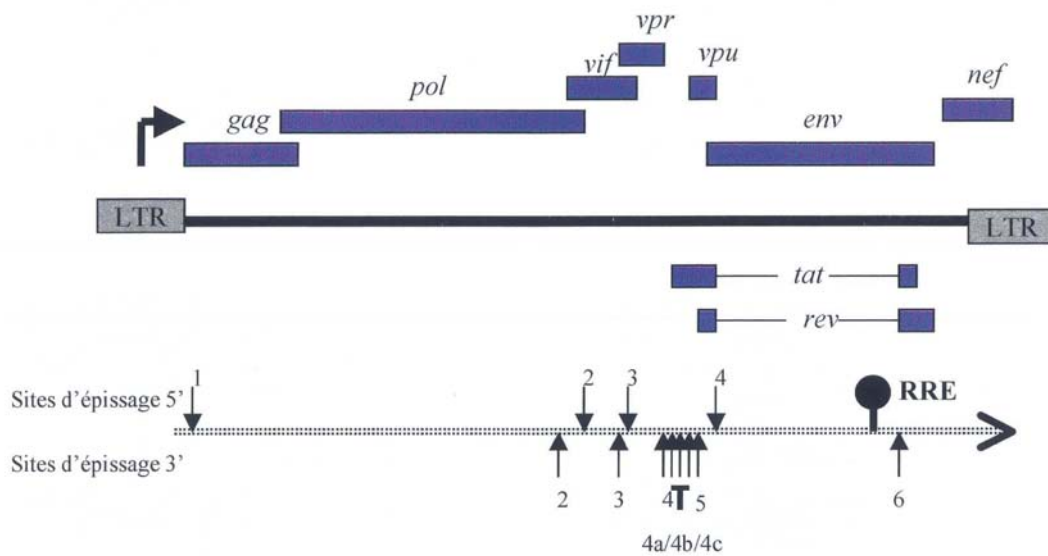


Figure 23 : Organisation génétique du HIV-1 et sites d'épissage.

Sont indiqués sur cette figure les 9 gènes codant pour les protéines virales, entourés des deux LTR en 5' et 3' de la séquence génomique. Le transcrit primaire issu de la transcription du génome complet est inscrit en dessous. Les sites d'épissage sont indiqués par des flèches pointant vers le haut pour les sites 3' et pointant vers le bas pour les sites 5'. L'élément de réponse à Rev (RRE) est situé dans le gène *env*, entre le site d'épissage 5' n°4 et le site 3' n°6.

Or, dans le cadre d'une infection rétrovirale, certains ARNs viraux non ou partiellement épissés atteignent le cytoplasme. Ceux-ci serviront alors de matrice pour la synthèse de protéines virales ou d'ARN génomique qui sera assemblé dans les nouveaux virions. Ainsi, les Rétrovirus ont développé des stratégies pour détourner les mécanismes de dégradation et de séquestration nucléaires, pour entraîner les ARNm viraux non complètement épissés vers le cytoplasme. Chez les Rétrovirus complexes, cette fonction particulière est contrôlée par une protéine virale spécifiquement impliquée dans la reconnaissance de ces ARNm et induisant leur accumulation dans le cytoplasme.

Pour le virus HIV-1, cette petite protéine a été identifiée sous le nom de Rev, qui signifie Régulateur de l'Expression des protéines du Virus (Pollard and Malim, 1998). Cette protéine a été découverte en 1986, juste après l'identification de la protéine virale activatrice Tat. En effet, en analysant finement la séquence de Tat, il a été remarqué que la délétion de régions voisines de la séquence *tat* conduisait à des virus exprimant correctement Tat mais incapables de produire les protéines Gag, Pol ou Env, et étaient par conséquent incapables de se répliquer

(Jones and Peterlin, 1994). Le gène impliqué, qui se superpose au gène *tat* avec un décalage de phase de lecture d'un nucléotide (+1), correspond à la séquence codant pour la protéine Rev.

Plusieurs travaux ont alors mis en évidence une hiérarchie dans la synthèse des différentes protéines virales, et démontré la nécessité de Rev pour l'expression des protéines tardives à partir des ARNm viraux non ou partiellement épissés (Kim et al., 1989 ; Felber et al., 1990). En effet, il a été montré qu'en l'absence d'une protéine Rev fonctionnelle, seuls les petits ARNm viraux multi-épissés étaient traduits en protéines, la traduction des transcrits de plus grande taille étant abolie. De ce fait, Rev joue un rôle fondamental dans le cycle viral et organise l'expression des gènes viraux en deux phases : une phase précoce durant laquelle s'expriment les gènes *tat*, *nef* et *rev* indépendamment de la présence de Rev, et une phase tardive où Rev permet l'expression des gènes *gag*, *pol* et *env* (**Figure 24**).

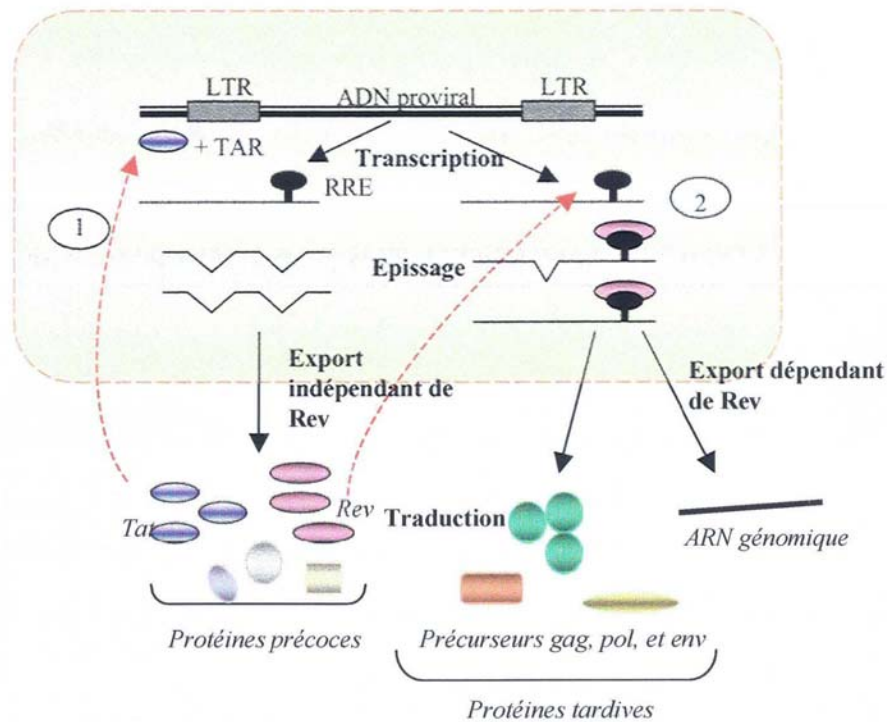


Figure 24 : Rev et le cycle viral.

Rev est une protéine régulatrice essentielle pour permettre la synthèse des neuf protéines et de l'ARN génomique du virus à partir d'une seule entité provirale. (1) Après la transcription de l'ADN proviral, les ARN pré-messagers sont épissés et exportés au cytoplasme pour y être traduits en protéines précoces, dont Tat et Rev. (2) Tat stimule la transcription virale à partir du LTR en se fixant sur TAR. Rev se fixe sur l'élément RRE présent sur les ARNm viraux non ou partiellement épissés, et les conduit dans le cytoplasme. Ces derniers seront traduits en protéines tardives ou génèrent les brins d'ARN génomique assemblés dans les nouvelles particules virales.

D'après Cullen, 2003

L'analyse des domaines structuraux de Rev a permis de comprendre comment cette protéine virale exerce sa fonction au sein de la cellule. Par ailleurs, plusieurs travaux ont permis de définir un élément présent sur les ARNm contenant un ou plusieurs introns et permettant leur reconnaissance par Rev, l'élément RRE (*Rev-Responsive Element*) (Malim et al., 1990). Cette séquence a été cartographiée au niveau du gène *env*, et est donc présente sur tous les ARNm viraux non ou partiellement épissés. La synthèse des protéines tardives du virus nécessite donc la présence de protéines Rev en quantités suffisantes, qui seront recrutées sur le RRE des ARNm viraux nouvellement transcrits.

III.2.1. Domaines fonctionnels de Rev

Rev est une petite protéine de 116 acides aminés, codée par deux exons qui expriment respectivement les résidus 1 à 26 et 27 à 116 de la séquence. Chacun de ces deux exons code pour des domaines essentiels pour la fonction de Rev, puisque la protéine dépourvue de l'un ou l'autre est inactive *in vivo* (Benko et al., 1990). En effet, cette protéine de 18 kDa environ possède plusieurs régions qui lui permettent de rentrer dans le noyau, de se fixer spécifiquement au motif RRE des ARNm viraux, de former des multimères le long de ces ARNm et de diriger le tout vers le cytoplasme en traversant de nouveau la membrane nucléaire. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que chacune de ces activités est dépendante d'un domaine spécifique de la séquence Rev (**Figure 25**) (Malim et al., 1989b).

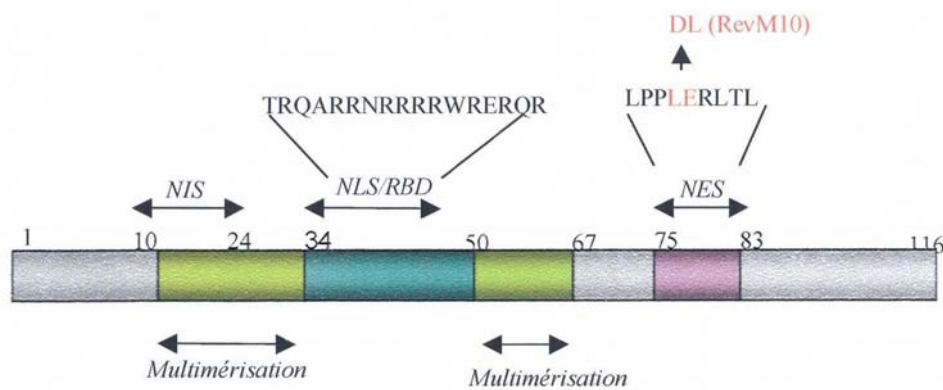


Figure 25 : Domaines fonctionnels de la protéine Rev du HIV-1.

La séquence de 116 acides aminés de Rev est subdivisée en plusieurs régions. La région amino-terminale contient un domaine riche en arginine (ARM), qui permet l'association de Rev avec sa séquence cible sur l'ARN, le RRE (RBD) et sert de signal de localisation nucléaire (NLS). Ce domaine est entouré de régions importantes pour la multimérisation de Rev sur l'ARN viral. Une petite séquence en amont a récemment été identifiée comme signal d'inhibition de diffusion nucléaire (NIS), important pour le maintien de Rev dans le cytoplasme. La partie carboxy-terminale contient le domaine activateur de Rev et est formé d'une séquence riche en leucine qui permet son export du noyau (NES). Le mutant RevM10, très couramment utilisé dans les études sur la protéine Rev, contient deux mutations sur les positions 78 et 79, qui résultent en un phénotype dominant négatif en *trans*.

a) La partie amino-terminale

Malgré plusieurs observations par immunofluorescence indirecte montrant une accumulation de Rev dans le noyau et les nucléoles de cellules transfectées (Cullen et al., 1988 ; Felber et al., 1989), son rôle dans le transport des ARNm requiert un équilibre dynamique entre cytoplasme et noyau. La région amino-terminale de Rev contient une séquence riche en arginines ou domaine ARM (*arginin-rich domain*), entre les résidus 34 et 50. Cette région contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NOS), qui est responsable de la localisation de Rev dans ces compartiments et permet l'import au noyau de protéines hétérologues sur lesquelles elle est transférée (McDonald et al., 1992 ; Cochrane et al., 1990).

La partie N-terminale de Rev est également impliquée dans sa liaison avec le motif RRE des ARNm, et sert donc de RBD (*RNA Binding Domain*). En effet, il a été montré que des mutations au niveau des résidus 14 à 20 génèrent des protéines incapables d'être importées au noyau et qui ne fixent plus le RRE, empêchant ainsi l'expression des gènes tardifs du virus (Hope et al., 1990). Ces protéines agissent comme mutants négatifs récessifs de la fonction Rev, puisqu'ils n'empêchent pas l'action de protéines Rev natives, capables de reconnaître les messagers viraux.

Par ailleurs, la comparaison de séquences Rev de différents isolats de HIV-1 indique une certaine variabilité des résidus 14 à 20, qui toutefois n'affecte pas la structure et la charge globalement positive du domaine N-terminal. Des travaux de mutagenèse du domaine ARM ont également indiqué que celui-ci adopte une conformation en hélice alpha, afin d'établir de fins contacts avec la séquence ARN (Hope, 1997). Ainsi, quatre résidus de Rev interviennent dans des contacts spécifiques avec le site primaire de liaison sur le RRE : trois arginine en position 35, 39 et 44 et le résidu asparagine en position 40 (Battiste et al., 1996). D'autres résidus contribuent à l'interaction Rev/RRE, dont la thréonine en position 34, le tryptophane en position 45 et les arginine en position 38, 41-43, 46 et 48, mais leur participation dans l'activité de Rev est moins importante (**Figure 26**).

(1)

DT**R**QAR**R**NRRR**R**WRERQRAAAAR

35 40 45 50

(2)

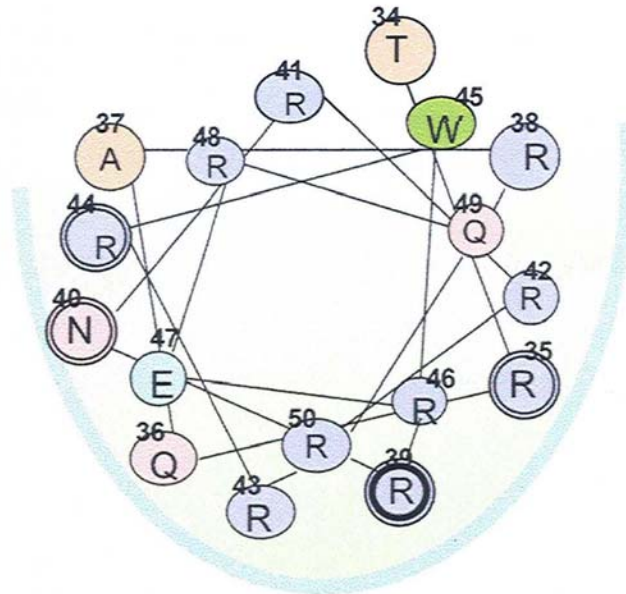


Figure 26 : Représentation schématique du domaine riche en arginine de Rev et de son interaction avec le RRE.

- (1) Séquence peptidique du domaine ARM de Rev, correspondant aux résidus 33 à 55 de la séquence complète de la protéine.
- (2) Représentation de l'hélice α adoptée par le domaine ARM de Rev pour s'insérer au creux de la poche formée par le site de haute affinité du RRE. Les résidus entourés d'un double cercle sont directement impliqués dans des interactions avec les bases de l'ARN.

D'après Hope, 1997

Cette région NLS/RBD est entourée de part et d'autre par des séquences moins bien définies, mais qui sont nécessaires pour la multimérisation de Rev le long de l'ARN (Madore et al., 1994 ; Zapp et al., 1991). Des expériences de mutagenèse couplées à des tests de fixation *in vitro* ont en effet révélé la participation de la partie N-terminale de Rev dans sa multimérisation sur l'ARNm.

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'association des protéines Rev entre elles, définissant diverses régions nécessaires. En particulier, il a été suggéré que le motif NES, présent dans la partie carboxy-terminale de Rev, participait à ces interactions, mais il est désormais admis que seules les deux régions entourant le domaine basique de Rev, c'est-à-dire les résidus 11-32 et 52-67, sont impliquées (Malim and Cullen, 1991). Des études récentes ont par ailleurs montré que ces deux régions ont un rôle distinct dans la polymérisation de Rev, l'une étant nécessaire pour la formation du dimère de Rev, et l'autre intervenant pour la fixation des monomères suivants (Tripathi and Brighty, 2005). De plus, certains résidus très conservés dans la séquence Rev sont essentiels pour la polymérisation, en particulier la leucine 12, la leucine 60 ou encore la valine 16 (Jain and Belasco, 2001).

Un troisième élément fonctionnel important pour l'activité de Rev a été plus tardivement identifié. Il s'agit d'une petite séquence située en amont de la région NLS/RBD, entre les résidus 10 à 24, et qui a été définie comme signal d'inhibition de diffusion nucléaire (*Nuclear diffusion Inhibitory Signal, NIS*) (Kubota and Pomerantz, 1998). Ce motif empêche la diffusion passive vers le noyau de Rev, qui est suffisamment petite pour traverser les pores nucléaires, et permet de maintenir un pool de protéines Rev dans le cytoplasme. Ce NIS est capable de séquestrer dans le cytoplasme des protéines hétérologues auxquelles il est fusionné, et un mutant Rev délété du NIS est inactif. Le NIS semble donc intervenir pour conserver une répartition correcte de Rev entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique, et son rôle pour la fonction biologique de Rev *in vivo* est essentiel. Par ailleurs, cette séquence est relativement bien conservée, et le NIS adopte une conformation tertiaire spécifique en double hélice, qui pourrait lui permettre d'interagir avec un facteur cytoplasmique empêchant Rev d'aller au noyau. De plus, le NIS se superpose avec quelques résidus impliqués dans l'oligomérisation. Il est possible que plusieurs NIS interagissent pour former des multimères de Rev, qui seraient alors trop gros pour diffuser passivement à travers les pores nucléaires.

b) La partie carboxy-terminale

La partie carboxy-terminale est communément appelée domaine d'activation (*Activation Domain, AD*). Cette région est le domaine effecteur de Rev, impliqué dans l'interaction avec des co-facteurs cellulaires et l'export des ARNm viraux dans le cytoplasme. Des mutations dans ce domaine génèrent des protéines capables de fixer le RRE, de multimériser sur l'ARN mais incapables d'être exportées au cytoplasme (Malim et al., 1991 ; Stauber et al., 1995 ;

Szilvay et al., 1995). De tels mutants agissent comme *trans*-dominants négatifs, en fixant les protéines Rev natives pour les séquestrer dans le noyau. En particulier, le mutant dominant négatif RevM10, dont les résidus 78 et 79 ont été mutés, possède un RBD intact pour la liaison au RRE, mais son domaine d'activation n'est pas fonctionnel (cf. **Figure 25**). De cette manière, RevM10 agit comme un inhibiteur compétitif de la fonction Rev (Malim et al., 1989b). Par ailleurs, des mutants dans le domaine d'activation semblent affecter la régulation de l'épissage des ARNm viraux, en augmentant le pool d'ARNm viraux multi-épissés au détriment de ceux non ou mono-épissés (Szilvay et al., 1999). Ces résultats suggèrent la participation de Rev dans le contrôle de l'épissage des ARNm viraux.

Le domaine d'activation contient une séquence riche en résidus leucine qui constitue un signal d'export nucléaire (*Nuclear Export Signal*, NES), apportant la preuve que Rev est bien impliquée dans l'export des ARNm viraux vers le cytoplasme (Fischer et al. 1995). Le NES de Rev fut le premier exemple de motif peptidique signal d'export nucléaire identifié (Szilvay et al., 1995 ; Meyer et al., 1996). Ce motif NES est présent sur de nombreuses protéines cellulaires et virales, qui peuvent ainsi être exportées rapidement au cytoplasme pour y exercer leur fonction. En particulier, l'inhibiteur de la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKI) et le facteur I- κ B ont un NES qui leur permet d'expulser vers le cytoplasme leur partenaire cellulaire respectif, la PKA et le facteur NF- κ B et d'inhiber ainsi leur activité (Wen et al., 1995 ; Fritz and Green, 1996). La protéine MAPKK (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*) est de la même manière conduite au cytoplasme grâce à sa séquence NES, pour y être activée (Fukada et al., 1996).

Par ailleurs, les lentivirus ainsi que les virus HTLV possèdent une protéine régulatrice fonctionnellement analogue à la protéine Rev du HIV-1. En particulier, la protéine Rex du HTLV-1 et les protéines Rev des virus EIAV (*Equine Infectious Anemia Virus*) et VV (*Visna Virus*) possèdent des séquences formant un NES, qui fonctionnent de manière autonome et peut être interchangeables pour promouvoir l'export de la protéine à laquelle elles sont fusionnées (Meyer et al., 1996 ; Hope et al., 1991 ; Weichselbraun et al., 1992). Par ailleurs, les séquences NES de la protéine Rev du HIV-1 et des protéines cellulaires PKI, I- κ B ou MAPKK sont capables d'entrer en compétition entre elles pour l'export des protéines ou de leur substrat, ce qui suppose l'existence d'une voie d'export nucléaire commune et

dépendante d'un signal NES, qui est utilisée par Rev pour exporter les ARNm viraux (Wen et al., 1995 ; Fritz and Green, 1996).

L'analyse comparative des domaines NES de ces protéines virales et cellulaires montre une séquence consensus riche en résidus leucine espacés de manière aléatoire (Hope et al., 1991 ; Bogerd et al., 1996). Cette séquence est très conservée chez tous les lentivirus, ce qui implique un rôle fondamental de ce domaine dans la fonction de Rev et corrobore l'idée de la participation d'un ou plusieurs facteurs cellulaires communs à ces virus (et au HTLV-1) et probablement très conservés dans le règne eucaryote (**Figure 27**).

HIV-1 Rev	L	P	P	-	L	E	R	-	L	T	L
HTLV-1 Rex	L	S	A	Q	L	Y	S	S	L	S	L
Visna Rev	M	V	G	-	M	E	N	-	L	T	L
RanBP1	V	A	E	K	L	E	A	-	L	S	V
IκBα	L	G	O	-	L	T	-	L	E	N	L
PKI	L	A	L	K	L	A	G	-	L	D	I
<i>Séquence consensus</i>	L	X	X	X	L	X	X	X	L	X	L/I

Figure 27 : Séquence peptidique des motifs NES de diverses protéines virales et cellulaires.

Alignement de séquences NES des protéines virales Rev du HIV-1, Rex du HTLV-1, et Rev du virus VV ; et des protéines cellulaires IκBα (*inhibitor of NF-κB*) et PKI (*inhibitor of cAMP-dependent protein kinase*). Pour chacune des séquences décrites, les résidus hydrophobes relativement conservés sont indiqués en rouge, et les tirets indiquent des résidus non conservés. La séquence consensus riche en leucine et définissant le NES est inscrite en dernière ligne.

Les séquences NLS et NES de Rev lui permettent d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme de la cellule, pour réguler le transport des ARNm viraux possédant le motif RRE. Ces domaines peuvent être interchangeés avec des séquences analogues présentes sur d'autres protéines. En effet, comme décrit précédemment, le motif NES de Rev est capable d'induire l'export de protéines hétérologues auxquelles il est fusionné, et la substitution du NES de Rev

par la séquence NES d'une autre protéine reconstitue une protéine fonctionnelle. De la même manière, des protéines chimères possédant Rev et le domaine RBD de la protéine d'enveloppe (*coat protein*) du bactériophage MS2 sont capables de fixer et d'exporter des ARN dans lesquels le RRE a été substitué par l'opérateur MS2 (Venkatesan et al., 1992). Ces protéines chimères sont par ailleurs plus actives lorsque l'ARN possède plusieurs copies de l'opérateur MS2, suggérant l'importance de la multimérisation de Rev pour l'export des ARNm (McDonald et al., 1992).

Toutefois, il est impossible de construire une protéine Rev active formée entièrement de séquences hétérologues, ce qui indique que d'autres attributs de la séquence de Rev, comme la région NIS, sont primordiaux pour son activité biologique. Par ailleurs, Rev subit une modification post-traductionnelle fréquemment rencontrée sur de nombreux substrats cellulaires, la phosphorylation. En effet, des études ont montré que Rev est phosphorylée *in vivo* par une kinase nucléaire, et ont suggéré que cette modification pouvait être modulée par des stimuli externes activant l'expression de cette kinase (Hauber et al., 1988 ; Cochrane et al., 1989a). Les sérines 8, 98 et 99 de la séquence Rev ont été identifiées comme les sites probables de la phosphorylation. Cependant, l'absence de phosphorylation n'affecte pas l'activité de Rev, indiquant que cette modification post-traductionnelle n'est pas indispensable à une fonction correcte de la protéine (Cochrane et al., 1989b).

III.2.2. Caractéristiques des ARNm viraux dépendants de Rev

Des expériences préliminaires ont très tôt abouti à l'identification d'une séquence présente dans la région *env* de l'ARN viral et reconnue par Rev, la séquence CAR (Cis-acting AntiRepression sequence) (Dayton et al., 1988). En présence de Rev, cette séquence est nécessaire et suffisante pour l'accumulation dans le cytoplasme des ARNm non ou partiellement épissés. Par ailleurs, il a été montré que la structure secondaire de la séquence CAR joue un rôle fondamental pour la reconnaissance de l'ARN par Rev ainsi que pour sa stabilisation (Dayton et al., 1989). Par la suite, cette séquence a été appelée RRE, en relation avec la spécificité de reconnaissance de Rev pour cet élément viral.

L'élément RRE est une structure ARN d'environ 240 nucléotides située dans l'intron *env*, entre le site 5' d'épissage n°4 et le site 3' d'épissage n°6. Il est ainsi présent sur tous les ARNm viraux qui ne sont pas complètement épissés (**cf. Figure 23**). La région spécifique

pour la reconnaissance de Rev a été cartographiée grâce à différents travaux. En particulier, la mutagenèse du RRE a montré que Rev se fixe spécifiquement et avec une très forte affinité au niveau d'une séquence de quelques 30 nucléotides et formant une structure secondaire particulière dans le RRE (Heaphy et al., 1990). En effet, seule la structure secondaire du RRE est fondamentale pour la liaison de Rev, et certaines variations de cette structure peuvent être tolérées si elles ne perturbent pas la conformation finale du RRE (Olsen et al., 1990). Des expériences d'interaction *in vitro* ont également défini un site minimal sur le RRE nécessaire à la liaison de Rev et ont déterminé les structures primaire, secondaire et tertiaire du RRE complet, et dégagé les prémices d'une interaction ARN/protéine très particulière (Cook et al., 1991 ; Bartel et al., 1991). La séquence primaire du site de haute affinité pour Rev est très conservée, et consiste en une soixantaine de nucléotides formant une structure en tige-boucle appelée domaine II. L'élément cœur, d'une trentaine de nucléotides, contient la tige IID et la tige-boucle IIB et forme une structure de nature hélicoïdale, légèrement distendue par deux appariements homopurine inhabituels. Ces paires de bases non conformes aux paires dites « de Watson-Crick » sont essentielles au maintien de la structure du domaine IID/IIB et permettraient l'établissement d'une conformation « ouverte » pour l'accès de Rev. Des analyses par résonance magnétique nucléaire ont montré que la légère contorsion de l'ARN permet à l'hélice α du RBD de Rev de venir s'insérer profondément dans la tige IID, établissant ainsi plusieurs contacts avec une large surface du RRE (cf. **Figure 26**) (Battiste et al., 1996). Des expériences de « *footprinting* » et d'interactions *in vitro* utilisant la protéine Rev entière et de plus larges fragments du RRE ont montré que plusieurs molécules Rev peuvent se fixer sur une même séquence RRE (Cook et al., 1991 ; Kjems et al., 1991). L'affinité globale de Rev pour l'ARN est par ailleurs plus forte sur le RRE entier que sur le site minimal, indiquant que la liaison de plusieurs monomères de Rev rend le complexe Rev/RRE plus stable. Ainsi, la fixation d'un premier monomère de Rev induit des changements conformationnels du RRE et rend accessibles d'autres sites de liaison pour Rev, d'une affinité plus faible que le site IIB/IID. La **Figure 28** représente les séquences primaire et secondaire du RRE, ainsi que les sites de liaison à Rev.

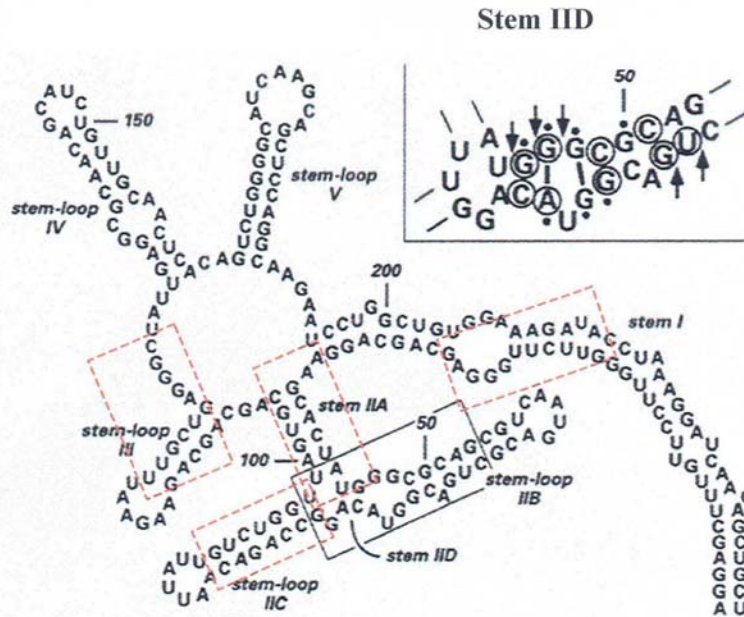


Figure 28 : Représentation de la structure secondaire du RRE.

Sont indiqués dans cette figure 234 nucléotides formant le RRE et la conformation secondaire qu'ils adoptent. Le site primaire de liaison à Rev est encadré en noir, et est décrit en détails dans le cadre en haut à droite (Stem IID). Les deux paires de bases non conformes sont définies par un tiret reliant les deux bases. Les bases entourées sont hautement conservées. Les points désignent les bases dont la modification chimique réduit dramatiquement la fonction Rev, et les flèches indiquent les positions sur lesquelles la modification de la structure secondaire est également délétère à l'activité de Rev. Les quatre sites potentiels de liaison à Rev sont encadrés en pointillés rouges. Il s'agit des régions I, IIA, IIC et III de la séquence RRE.

D'après Pollard and Malim, 1998.

Les ARNm viraux dépendants de Rev possèdent également des séquences de répression (*Cis-acting Repressive Sequences*, CRS) ainsi que des séquences d'instabilité (*Instability Sequences*, INS). Lorsqu'elles sont fusionnées à des gènes hétérologues, ces séquences sont capables d'en inhiber l'expression, inhibition qui peut être levée par l'action de Rev/RRE. Elles sont distribuées le long des régions introniques du génome viral, et sont généralement riches en bases adénine (A) et uracile (U). Ces séquences AU sont des déterminants importants de l'instabilité de nombre d'ARNm cellulaires dont la durée de vie est très courte, comme les ARNm codant pour certaines cytokines ou pour des proto-oncogènes (Chen and Shyu, 1995). La contribution de ces séquences dans l'expression virale n'est pas clairement définie, mais il est probable que Rev masque les CRS et INS pour empêcher la séquestration et la dégradation des ARNm viraux dans le noyau (D'Agostino et al., 1992).

Par ailleurs, les ARNm viraux possèdent des signaux pour moduler l'efficacité de leur épissage, afin d'assurer la présence dans le noyau d'un pool d'ARNm non complètement épissés qui sortira du noyau. En effet, la présence au sein des ARNm viraux d'éléments stimulateurs (*enhancer*) et répresseurs (*silencer*) régule l'épissage et permet une production équilibrée des protéines virales dans la cellule (Staffa and Cochrane, 1995). Ces séquences semblent également être des éléments de liaison pour des facteurs cellulaires qui participent à l'épissage des ARN pré-messagers tout en les séquestrant dans le noyau (Amendt et al., 1994). Ainsi, certains sites d'épissage sont utilisés de manière inefficace par la machinerie cellulaire, et la maturation d'une partie des ARNm viraux n'est pas achevée. En présence de Rev, ces ARNm viraux, qui contiennent encore au moins un intron, ne sont pas dégradés. Le mécanisme moléculaire exact expliquant ce phénomène n'est pas encore élucidé, mais il est probable que la fixation de Rev sur les ARNm soit impliquée dans la modulation de leur épissage (Kjems and Sharp, 1993).

III.2.3. Fixation de Rev sur les ARNm viraux

Les interactions entre Rev et le RRE sont très bien décrites, tant au niveau de la surface d'attache sur la séquence RRE que du domaine de liaison sur la protéine Rev. Par ailleurs, la présence de multiples sites de liaison pour Rev sur le RRE implique la formation de complexes oligomériques constitués de plusieurs molécules Rev fixées sur un même ARN. Les mécanismes intervenant dans cette étape de multimérisation ne sont pas clairement définis, mais cette polymérisation est essentielle pour former un complexe ribonucléoprotéique stable qui pourra être exporté vers le cytoplasme. En effet, des mutations dans Rev au niveau des séquences nécessaires pour sa multimérisation abolissent à la fois sa capacité d'oligomérisation et de fixation à l'ARN, ce qui suppose que l'oligomérisation est essentielle à la fixation de Rev sur le RRE (Malim et al., 1989b ; Daly et al., 1993). Par ailleurs, des mutations dans le domaine activateur (NES) de Rev génèrent des protéines capables de former des complexes stables avec les protéines Rev natives dans le noyau ou le cytoplasme, mais ces complexes sont inactifs (Hope et al., 1992). En effet, la co-expression de protéines Rev natives et de mutants NES-déficients inhibe fortement l'export des complexes RNP, indiquant que les différentes protéines Rev peuvent interagir via d'autres sites que le NES, mais que ce « déficit » en NES empêche probablement le recrutement de facteurs essentiels à l'export (Malim et al. 1989b).

Selon cette même hypothèse, il a été montré qu'un complexe binaire Rev/RRE, bien que capable de recruter le facteur d'export cellulaire CRM1 grâce à l'unique motif NES, n'est pas capable d'être exporté (Malim and Cullen, 1991). Par ailleurs, des études récentes avec le mutant RevM4 (muté sur les positions 23, 25 et 26) ont montré que la dimérisation de Rev sur l'ARN permet d'exposer des domaines basiques libres, disponibles pour la liaison de facteurs cellulaires, tandis que le complexe oligomérique reste stablement fixé sur l'ARN (Furnes et al., 2005).

Ces résultats montrent l'importance de l'oligomérisation et du motif NES pour la fonction de Rev. Ils indiquent en effet que le domaine d'activation ainsi que les régions nécessaires à l'oligomérisation sont nécessaires pour les interactions protéines-protéines sur le RRE, et suggèrent la participation d'un ou plusieurs co-facteurs cellulaires qui se fixeraient sur l'oligomère grâce à la présence de régions répétées de la séquence Rev (Bogerd and Greene, 1993).

Par ailleurs, la présence de plusieurs molécules de Rev sur l'ARN pourrait être importante pour stabiliser le complexe Rev/RRE dans le noyau, en empêchant la fixation des facteurs de rétention nucléaire sur l'ARNm ou en limitant l'accès des facteurs d'épissage (Heaphy et al., 1991). Selon cette hypothèse, il a été montré que Rev forme des structures filamenteuses le long du RRE *in vitro*, ce qui pourrait bloquer la liaison de facteurs d'épissage cellulaires ou dissocier ceux déjà présents sur l'ARNm.

Il n'est pas encore bien défini si Rev se fixe sur le RRE en tant que complexe préformé de deux molécules Rev ou plus, ou si l'oligomérisation a lieu suite à la fixation du premier monomère de Rev sur l'ARN. Il a été montré que Rev est capable de s'auto-associer en l'absence du RRE *in vitro* (Zapp et al., 1991) et *in vivo* (Szilvay et al., 1997), suggérant que la formation de complexes de Rev pourrait avoir lieu avant la liaison sur l'ARN. Par ailleurs, cette oligomérisation de Rev a été supposée importante pour son import dans le noyau, puisqu'un mutant déficient pour l'oligomérisation reste séquestré dans le cytoplasme (Szilvay et al., 1997). Cependant, des essais de fixation *in vitro* ont montré que Rev se fixe en tant que monomère sur le site de haute affinité du RRE, le domaine IIB/IID. Cette interaction entraîne des modifications localisées de la structure du RRE, qui stabilisent le complexe binaire Rev/ARN (Cook et al., 1991). D'autres molécules Rev peuvent alors se fixer sur le complexe, par des interactions protéine-protéine et ARN-protéine faisant intervenir d'autres résidus que

ceux impliqués dans l'interaction primaire. Il s'avère donc que de multiples régions de Rev, outre celles entourant le NLS, interviennent dans la formation du complexe oligomérique sur l'ARNm viral.

Ainsi, la fixation du premier monomère de Rev faciliterait la fixation du second, puis du troisième monomère, jusqu'à former un complexe multimérique qui sera exporté. Ce modèle de fixation coopérative semble désormais admis, où la fixation de chaque monomère se fait de manière symétrique selon un schéma « queue-à-queue et tête-à-tête » (**Figure 29**) (Jain and Belasco, 2001). Ce scénario explique la participation de résidus éloignés dans la séquence Rev, dont la leucine en position 12 et 60 et la valine en position 16, qui font en fait partie de l'une ou l'autre des deux régions, « tête » ou « queue », de Rev.

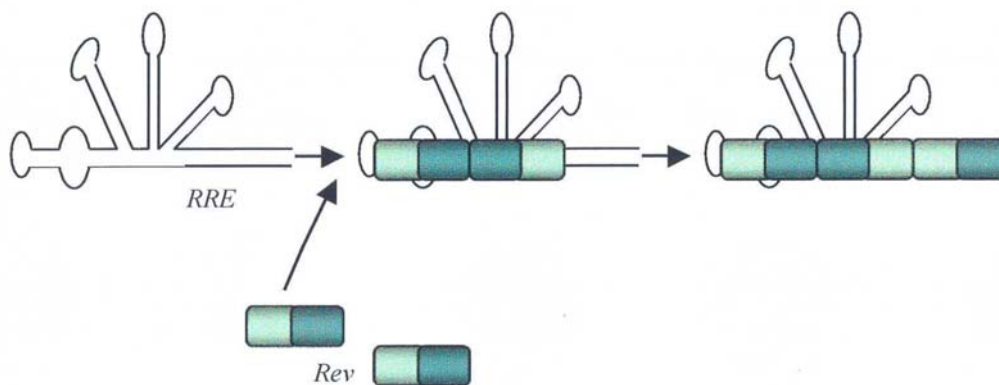


Figure 29 : Modèle de multimérisation de Rev sur le RRE.

Rev se fixe sur le site de haute affinité sur le RRE, la tige-boucle IIB. La fixation de ce premier monomère provoque de fines modifications structurales qui permettent la fixation d'un second monomère de Rev, puis des monomères suivants. Il est également possible que Rev s'associe en dimère avant de se fixer sur le site IIB. L'association des monomères entre eux s'effectue selon un modèle de « queue à queue, tête à tête », expliquant la participation de résidus éloignés de la séquence Rev.

Aucune étude n'a été en mesure de déterminer avec certitude le nombre exact de molécules Rev qui se fixent sur le RRE *in vivo*. Plusieurs travaux supposent que Rev se fixe sur l'ARN

en tant que tétramère (Zapp et al., 1991 ; Hope et al., 1992 ; Van Ryk and Venkatesan, 1999). D'autres ont établi cette stœchiométrie à 8 molécules de Rev pour une molécule d'ARN, mais elle reste moins probable bien qu'il soit possible de pousser ce chiffre jusqu'à plus de 10 en présence d'un large excès de protéines Rev *in vitro* et *in vivo* (Cook et al., 1991 ; Van Ryk and Venkatesan, 1999).

III.2.4. Rôle de Rev sur l'expression des ARNm viraux non ou partiellement épissés

Il est entendu que, contrairement à Tat, Rev n'agit pas sur les étapes de transcription virale puisqu'elle n'affecte aucunement la quantité totale des ARNm viraux présente dans la cellule. En effet, il est désormais admis que la fonction primaire de Rev est de diriger spécifiquement les ARNm viraux non complètement épissés vers le cytoplasme, pour permettre la synthèse des protéines tardives du virus et l'apparition dans le cytoplasme de brins d'ARN génomique. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres fonctions découlent de cette activité. En particulier, le rôle de Rev dans l'export semble intimement lié à une action sur l'épissage, puisqu'il implique l'éloignement des ARNm non complètement épissés à l'écart de la machinerie d'épissage présente dans le noyau.

Par ailleurs, l'identification de la séquence RRE et des éléments régulateurs de l'épissage sur le gène *env* suggère l'implication de Rev à la fois dans le contrôle de l'épissage, de la stabilité et de l'export des ARNm. En effet, ces éléments semblent être responsables de la faible expression des ARNm viraux en l'absence de Rev, notamment en affectant leur localisation intranucléaire (Felber et al., 1989 ; Hadzopoulou-Cladaras et al., 1989 ; Favaro et al., 1998). Cela suppose que Rev est capable de reconnaître certains ARNm nouvellement issus de la transcription, pour empêcher leur maturation ou leur dégradation et permettre leur expression.

a) Export des ARNm viraux

Bien que les nombreux travaux effectués démontrent un effet pléiotrope de Rev sur les ARNm viraux, son action principale intervient dans la reconnaissance et l'export des messagers viraux non ou partiellement épissés (Pollard and Malim, 1998). En effet, des expériences de microinjection dans des oocytes de *Xenopus* ont permis de prouver de manière pertinente que Rev agit spécifiquement au niveau de l'étape d'export de ces ARNm. Ces travaux ont démontré que la présence de Rev ne modifie pas le rapport quantitatif entre ARN

épissés et ARN non ou mono-épissés, mais qu'elle provoque l'accumulation de ces derniers dans le cytoplasme (Fischer et al., 1994). Ils ont également montré que Rev induit l'export des ARNm viraux grâce à son motif NES, selon un processus actif et saturable, mais distinct de celui utilisé pour l'export des ARNm cellulaires (Fischer et al., 1995).

b) Stabilité dans le noyau et transport

Plusieurs travaux ont indiqué que Rev agit sur la stabilité et le transport des ARNm viraux non ou partiellement épissés, et exerce ainsi un rétrocontrôle négatif sur l'expression des gènes précoces (Arrigo et al., 1989 ; Felber et al. 1990 ; Malim and Cullen, 1993). En effet, dans des conditions de blocage de la transcription, la présence de Rev augmente la demi-vie des ARNm non ou partiellement épissés. Par ailleurs, l'utilisation de vecteurs proviraux dépourvus de sites d'épissage a montré que la stabilisation de ces ARNm est indépendante d'une régulation de leur épissage. Ainsi, en recrutant les ARNm directement après leur transcription, Rev semble réduire la quantité d'ARNm viraux disponibles dans le noyau pour l'épissage. Sa fonction d'export des ARNm serait donc intimement liée à un rôle stabilisateur des transcrits viraux dans le noyau.

c) Contrôle de l'épissage

Il est également probable que, en reconnaissant spécifiquement les ARNm viraux, Rev exerce un contrôle sur leur maturation et leur devenir, en bloquant directement les processus d'épissage. En effet, certains sites d'épissage sur les ARNm viraux sont utilisés de manière inefficace, ce qui retarde une maturation autrement trop rapide et permet la fixation de Rev. Par ailleurs, des travaux ont montré que Rev, en s'associant avec l'ARNm viral dans le noyau, empêche la formation du complexe d'épissage, ou *spliceosome* (Kjems and Sharp, 1993). De cette manière, Rev serait capable d'arrêter les processus d'épissage pour garantir un pool d'ARNm viraux non ou partiellement épissés dans le noyau.

Par ailleurs, Rev semble agir sur la localisation intranucléaire des ARNm non épissés, en les dirigeant dans différents compartiments subnucléaires, dont les nucléoles. Rev pourrait ainsi détourner les nouveaux transcrits viraux de la machinerie cellulaire d'épissage ou de dégradation (Favaro et al., 1998).

L'étude des mutants *trans*-dominants négatifs de Rev apporte également des arguments en faveur d'un rôle de Rev sur l'épissage. Ces mutants semblent à la fois séquestrer la protéine

Rev sauvage dans le noyau et affecter l'activité d'épissage des ARNm viraux (Szilvay et al., 1999). En effet, leur présence dans la cellule stimule l'activité d'épissage des ARNm viraux, entraînant l'augmentation des protéines issues des ARNm viraux multi-épissés. Selon ces observations, Rev aurait un effet modulateur sur l'épissage, afin d'assurer au virus l'expression des protéines tardives et la formation de l'ARN génomique à partir d'ARNm non ou partiellement épissés.

d) Régulation de la traduction

Plusieurs travaux sont en faveur d'un rôle de Rev sur la traduction dans le cytoplasme des ARNm viraux non ou partiellement épissés (Arrigo and Chen, 1991 ; D'Agostino et al., 1992). En effet, il a été montré que ces ARNm viraux apparaissent dans le cytoplasme en l'absence de Rev, mais qu'ils ne sont pas traduits. Il a ainsi été proposé que la fixation de Rev sur les messagers viraux induit le recrutement des polysomes, pour permettre la synthèse des protéines (D'Agostino et al., 1992).

Il est également probable que la liaison de Rev sur les ARNm viraux restaure la liaison de facteurs sur des sites autrement masqués sur les ARN. Parmi ceux-ci, il a été suggéré que Rev pourrait permettre l'accès à la protéine PAB1 (*Poly(A)-Binding protein 1*), qui se lie classiquement sur la région poly(A) des ARNm maturés et intervient sur leur stabilité et leur traduction (Campbell et al., 1994).

D'autres travaux plus récents ont montré que Rev stimule la traduction de l'ARNm *env*, en recrutant directement un ou plusieurs acteurs cellulaires de la synthèse protéique ou en séquestrant un facteur répresseur de la traduction (Perales et al., 2005). L'identification de facteurs interagissant avec Rev et impliqués dans la synthèse protéique supporte l'hypothèse d'un rôle de Rev dans le contrôle de la traduction. Parmi eux, le facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF-5A, qui fixe le complexe Rev/RRE dans le noyau, pourrait permettre la traduction préférentielle des ARNm viraux exportés au cytoplasme (Ruhl et al., 1993). Il semble alors nécessaire que l'ARNm viral soit complexé à la protéine virale Rev et à d'autres facteurs cellulaires pour pouvoir accéder efficacement à la machinerie traductionnelle.

III.2.5. Les partenaires cellulaires de Rev

Nous avons vu que Rev est une protéine possédant à la fois des séquences NLS et NES qui lui permettent d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme de la cellule, pour transporter

les ARNm viraux vers le cytoplasme. Pour cette fonction, Rev utilise les voies de transport nucléo-cytoplasmique de la cellule et recrute un certain nombre de facteurs cellulaires. De nombreux travaux se sont appliqués à rechercher les protéines interagissant avec Rev, et en particulier avec sa séquence NES, afin de décrire finement les mécanismes impliqués dans l'export des ARNm viraux par Rev. Plusieurs protéines cellulaires ont ainsi été décrites, dont certaines sont impliquées directement dans le transport nucléaire, alors que d'autres ont des fonctions plus éloignées.

a) Import de Rev au noyau et reconnaissance de ARNm viraux

Pour son import jusqu'au noyau et aux nucléoles, il est probable que Rev utilise la protéine B23 ou nucléophosmine. B23 est une protéine abondante dans le noyau et les nucléoles, et capable d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme. Des auteurs ont montré qu'elle peut stimuler l'import de Rev en se liant directement au NLS (Szebeni et al., 1997). Par ailleurs, B23 peut être phosphorylée, ce qui augmente son affinité pour les composants nucléolaires, et pourrait entraîner Rev dans ces compartiments. B23 possède deux séquences de type NLS situées de part et d'autre d'un domaine acide. Il semblerait que ce dernier intervienne dans l'interaction affine avec le NLS de Rev, qui profiterait alors des propriétés de B23 pour accéder efficacement au noyau. Il est également possible que B23 agisse comme chaperon moléculaire de Rev jusqu'aux nucléoles. Cependant, B23 ne semble pas absolument nécessaire pour l'import de Rev, qui peut atteindre les nucléoles en son absence.

La fonction de B23 dans la cellule n'est pas encore bien définie, elle pourrait avoir un rôle dans la synthèse des ribosomes, en recrutant les protéines ribosomiques dans les nucléoles pour leur assemblage en ribosomes fonctionnels. Par ailleurs, elle stimule l'activité nucléolaire, importante pour la prolifération cellulaire, et serait impliquée dans le développement de tumeurs en régulant l'activité de la protéine p53 (Chan et al., 2005).

A l'intérieur du noyau, Rev s'accumule dans différents compartiments subnucléaires, probablement pour diriger les ARNm viraux à l'écart des facteurs d'épissage ou de dégradation puis les emmener au cytoplasme. Ainsi, il a été montré que Rev interagit avec l'ARNm au niveau des sites de transcription et de maturation, où sont accumulés des facteurs d'épissage dont SC-35 (Kalland et al., 1994 ; Boe et al., 1998). SC-35 est une protéine appartenant à la famille des protéines de liaison à l'ARN riches en SR (*serine-arginine rich*) impliquées dans la régulation de l'épissage des ARN pré-messagers cellulaires. En interagissant avec l'ARN viral, il est probable que Rev dissocie les facteurs d'épissage et

empêche l'assemblage du complexe d'épissage de l'ARN (*spliceosome*), pour ensuite recruter d'autres facteurs lui permettant de sortir du noyau.

Le facteur SF2/ASF (*Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor*) est un facteur de la même famille que SC-35, qui intervient également dans l'épissage des ARNm viraux et régule la fonction Rev. Dans le cadre d'une infection par HIV-1, ce facteur est directement recruté sur des séquences spécifiques régulant l'épissage de l'ARN pré-messager viral (Caputi et al., 2004). Ce facteur est en effet capable de se fixer sur le RRE des ARNm viraux, dans un site voisin du site de liaison à Rev (Powell et al., 1997). Ainsi, en présence de Rev, SF2/ASF permet l'inhibition de l'épissage des ARNm viraux sur lesquels il est fixé. Cependant, en large excès de SF2/ASF, l'activité de Rev est réduite et l'épissage des ARNm viraux est accru, provoquant l'accumulation des protéines précoces au détriment des protéines tardives du virus (Pongoski et al., 2002). Il apparaît alors que l'inhibition de l'activité des protéines SR est nécessaire pour protéger l'ARNm viral de l'épissage lors de la phase tardive du cycle viral.

Des travaux ont montré que Rev interagit par son domaine ARM avec la protéine p32, un inhibiteur de l'épissage associé au facteur SF2/ASF, ce qui protège l'ARNm viral contre l'épissage et soutient l'activité de Rev (Zheng et al., 2003b). En effet, p32 inhibe spécifiquement le facteur SF2/ASF en bloquant sa phosphorylation et donc son association avec l'ARN. Cette protéine p32 est inactive chez la souris, dans laquelle la réplication virale ne peut être productive. Ce défaut de multiplication du virus est en partie dû à une mutation dans la protéine p32 murine, pas substitution du résidu glycine 35 en un résidu asparagine, qui inactive complètement la protéine et provoque l'épissage excessif des ARNm viraux.

b) Export de Rev et des ARNm viraux dans le cytoplasme

Le transport des complexes liés à Rev (exportosome) implique également des interactions avec plusieurs co-facteurs présents dans le noyau. En effet, la formation d'un multimère de Rev sur l'ARNm viral suggère la liaison de plusieurs facteurs sur le complexe qui sera envoyé vers le cytoplasme.

b.1) Le facteur d'export CRM1

Le facteur CRM1/exportine 1 a été le premier partenaire de Rev identifié. Cette protéine d'environ 112 kDa est un membre de la famille des récepteurs impliqués dans le transport

nucléaire, les importine β . Le gène *crm1* a été initialement découvert chez des mutants de *Schizosaccharomyces pombe* dont la croissance est sensible à la baisse de température (Adachi and Yaganida, 1989). En effet, des mutations conditionnelles du gène *crm1* entraînent une déformation des chromosomes, suggérant un rôle de CRM1 dans le maintien de la structure des chromosomes, d'où sa dénomination « CRM1 » (*Chromosome Region Maintenance 1*). Cette altération chromosomique est d'ailleurs probablement une conséquence secondaire du rôle de CRM1 dans le transport nucléaire. Ce même phénotype a été observé quelques années plus tard chez *Saccharomyces cerevisiae*, où la déplétion en CRM1 entraîne également la rétention des ARN polyadénylés dans le noyau, indiquant un rôle probable de CRM1 dans le transport de certains ARN cellulaires vers le cytoplasme (Neville et al., 1997).

Le rôle de CRM1 dans le transport dépendant de Rev a été initialement suggéré après l'utilisation d'un antibiotique antifongique, la leptomycine B (LMB), qui induit l'arrêt du cycle cellulaire eucaryote en phases G1 et G2. En effet, des études de toxicité de la LMB sur différentes souches de *S. pombe* ont montré un lien entre la sensibilité à cet antibiotique et le gène *crm1*. Par ailleurs, les phénotypes observés sur des cellules déplétées en CRM1 et traitées avec l'antibiotique rappellent ceux des mutants sensibles à la température (Nishi et al., 1994). De plus, CRM1 possède des similarités de séquences avec le domaine de liaison à RanGTP de l'importine β , dont la fonction dans le transport nucléaire est reliée à son affinité pour les pores nucléaires (*Nuclear Pore Complex, NPC*).

Par la suite, il a été montré que CRM1 est localisé à la fois dans le nucléoplasme, dans les nucléoles et au niveau des pores nucléaires, et est capable de s'associer avec plusieurs nucléoporines *in vivo*, dont Nup214/CAN et Nup88 (Fornerod et al., 1997a). CRM1 est donc un facteur nucléaire soluble, capable d'interagir avec certains composants des NPC pour être expulsé du noyau.

Plusieurs auteurs ont alors montré que CRM1 est capable de se fixer sur des motifs NES *in vitro*, à partir de lysats d'oocytes de *Xenopus* ou d'extraits cellulaires (Fornerod et al., 1997b ; Ossareh-Nazari et al., 1997), ou dans des systèmes utilisant les protéines recombinantes purifiées (Fukada et al., 1997). CRM1 est donc un facteur d'export pour les protéines à motif NES, comme Rev, MAPKK, ou encore PKI. Par ailleurs, il a été observé que le transport de ces protéines vers le cytoplasme est inhibé par la Leptomycine B. Cette inhibition provient de l'interaction directe entre CRM1 et la LMB, qui altère la liaison de CRM1 sur le NES

(Fornerod et al., 1997b). Par son rôle dans l'export nucléaire, CRM1 prend désormais l'appellation d'exportine 1.

Des expériences de criblage en double hybride chez la Levure *S. cerevisiae* ont démontré que CRM1 interagit à la fois avec Rev et avec Ran (Stade et al., 1997 ; Neville et al., 1997). Ainsi, la protéine CRM1 humaine (hCRM1) interagit avec la protéine nucléaire RanGTP en présence de Rev, induisant ainsi la formation d'un complexe ternaire CRM1/Rev/RanGTP stablement fixé sur l'ARNm viral dans le noyau (Askjaer et al., 1998). C'est ce complexe ternaire qui serait sensible à la LMB et à des mutations du NES, NES qui interviendrait au moment de l'association de RanGTP. En particulier, le mutant RevM10 est capable de fixer CRM1, mais il pourrait séquestrer les complexes Rev/CRM1 dans le noyau en bloquant la liaison de CRM1 avec RanGTP. De même, la LMB s'associe avec hCRM1 dans le complexe hCRM1/Rev/RanGTP et induit des modifications conformationnelles déstabilisant le complexe et empêchant son export (Hakata et al., 2002).

b.2) Les nucléoporines

Outre cette interaction avec CRM1, essentielle à Rev pour être exportée vers le cytoplasme, Rev interagit directement avec des composants des pores nucléaires, pour y diriger les ARNm viraux et les faire passer dans le compartiment cytoplasmique. Ainsi, Rev interagit successivement ou simultanément avec différentes nucléoporines, de manière hiérarchisée pour permettre le transport des complexes liés à Rev à travers les NPC.

Grâce au criblage par double hybride chez la Levure *S. cerevisiae*, plusieurs auteurs ont identifiés différentes nucléoporines interagissant avec le NES de Rev. Ainsi, la protéine hRip/Rab (*human Rev interacting protein/Rev activation domain-binding protein*), et son homologue Rip1p chez la Levure, a été initialement décrite comme le co-facteur cellulaire de la fonction Rev (Bogerd et al., 1995 ; Stutz et al., 1995 ; Fritz et al., 1995). hRip/Rab est en effet capable de fixer spécifiquement le NES de Rev *in vitro* et de promouvoir l'export des ARN liés à Rev *in vivo*. Cette protéine a rapidement été rattachée à la famille des nucléoporines, puisqu'elle est localisée à la fois dans le noyau, le cytoplasme et au niveau des pores nucléaires et qu'elle possède de fortes homologies de séquence avec les nucléoporines, dont les répétitions du dipeptide Phénylalanine-Glycine (FG). hRIP est également capable de lier des séquences NES d'autres protéines virales comme la protéine Rex du virus HTLV-1 ou Rev du virus EIAV, d'où l'appellation Rab (*Rev/Rex activation domain binding*). Par ailleurs,

c'est cette protéine qui a permis de définir la séquence consensus NES riche en leucines (Bogerd et al., 1996).

Par la suite, des auteurs ont montré que Rev interagit avec d'autres protéines contenant des répétitions FG, chez *S. cerevisiae* et chez les Vertébrés. En particulier, la nucléoporine Nup153 est l'une des premières rencontrée au niveau de la face interne du NPC. Des travaux ont montré qu'elle participe à l'export des ARNm viraux dépendants de Rev, probablement en fixant les ARN, grâce à ses domaines en doigts de zinc ou indirectement via une protéine adaptatrice (Ullman et al., 1999). Par ailleurs, les nucléoporines Nup98 et Nup214 sont des facteurs solubles dans le noyau, qui permettraient de diriger l'exportosome à proximité des pores nucléaires (Zolotukhin and Felber, 1999). Ces deux nucléoporines sont associées à CRM1 (et RanGTP) dans des complexes dynamiques, supposant que CRM1 sert de pont pour associer Rev aux nucléoporines Nup98 et Nup214 (Fornerod et al., 1997a). Par ailleurs, l'interaction Rev/Nup98 est plus avide que la liaison Rev/hRip, ce qui suggère qu'une interaction forte entre Rev et Nup98 a lieu initialement dans le nucléoplasme ou les nucléoles, pour former des complexes intermédiaires ARN/Rev/CRM1/Nup98/Nup214 qui seront dirigés vers les NPC. Il s'en suit alors plusieurs interactions successives, dont hRip, qui propulsent le complexe à travers les NPC jusqu'au cytoplasme. Des études plus récentes ont montré que l'interaction de Rev avec Nup98 est indépendante de CRM1, puisque des mutations de CRM1 abolissant la liaison Rev/hRip n'affectent pas l'interaction Rev/Nup98. Par ailleurs, l'accumulation des complexes ARN/Rev vers les NPC est insensible à un traitement à la Leptomycine B, ce qui suggère l'intervention de facteurs comme Nup98 pour diriger les complexes vers la membrane nucléaire, indépendamment de CRM1 (Kiss et al., 2003).

La protéine NLP-1 (*Nucleoporin-Like Protein 1*), localisée à la membrane nucléaire et présentant de fortes homologies de séquences avec hRip, jouerait également un rôle dans la progression de l'exportosome vers et à travers les pores nucléaires (Farjot et al., 1999).

Le rôle de hRip dans le transport de l'exportosome reste encore évasif, puisqu'on ne sait pas réellement à quel niveau elle intervient. Il a récemment été montré qu'elle serait impliquée non pas dans le transport intranucléaire des complexes RNP, mais dans leur mouvement depuis les NPC jusqu'au cytoplasme (Sanchez-Velaz et al., 2004). En effet, en l'absence de hRip fonctionnelle, les complexes ARN liés à Rev se retrouvent accumulés à la périphérie nucléaire dans le cytoplasme, là où est localisée normalement hRip. hRip pourrait donc

intervenir dans la dissociation des complexes à leur sortie du noyau, ou recueillir l'ARN dissocié des complexes dans le cytoplasme pour le diriger vers la machinerie traductionnelle. Par cette association avec hRip, Rev semble donc impliquée en partie dans la régulation de la traduction des ARNm viraux qu'elle expulse du noyau. Par ailleurs, l'association de Rev avec de multiples composants des pores nucléaires suggère une dissociation accélérée du complexe d'épissage (*spliceosome*) au niveau des NPC, et donc la participation de Rev dans l'inhibition de l'épissage des ARNm viraux.

b.3) Le facteur eIF-5A

D'autres protéines aux fonctions différentes du transport nucléaire interagissent avec Rev. Parmi elles, le facteur d'initiation eucaryote eIF-5A semble jouer un rôle direct dans la fonction Rev. La liaison de Rev avec eIF-5A a été déterminée grâce à des expériences d'interaction utilisant des extraits nucléaires et un peptide de synthèse correspondant au NES de Rev (Ruhl et al., 1993). Cette interaction a été confirmée par des tests sur des oocytes de *Xenopus*, qui ont indiqué que la présence de eIF-5A est nécessaire à la *trans*-activation par Rev d'un ARN rapporteur. A l'inverse, des mutants de eIF-5A capables d'interagir avec le complexe Rev/ARN empêchent l'export nucléaire de Rev et inhibent la réplication du HIV-1 dans des expériences de microinjection de cellules somatiques (Bevec et al., 1996). Par ailleurs, il a été montré que eIF-5A est une véritable protéine navette, qui s'accumule au niveau des filaments intranucléaires des NPC et interagit avec CRM1. D'autres auteurs ont montré que eIF-5A s'associe avec les nucléoporines Nup214, Nup98, Nup153 et Nup62, ainsi qu'avec l'actine (Hofmann et al., 2001). Ces travaux ont ainsi soulevé l'idée d'un rôle de l'actine, qui peut être associée aux filaments nucléoplasmiques des NPC, dans l'export nucléaire. Il est donc probable que eIF-5A agisse comme un adaptateur pour la liaison entre Rev et CRM1 au niveau de la face interne des NPC, et permette la translocation de l'exportosome vers le cytoplasme.

De manière intéressante, bien que eIF-5A semble à l'origine impliqué dans l'initiation de la traduction, sa fonction normale n'est pas connue. Cette protéine est retrouvée dans toutes les cellules eucaryotes ainsi que chez les archéobactéries, ce qui suppose que sa fonction est essentielle pour la croissance cellulaire. Il a à l'origine été suggéré que eIF-5A stimulait la formation de la première liaison peptidique lors de la synthèse protéique (Park, 1989 ; Smit-McBride, 1989). De plus, eIF-5A est la seule protéine connue à posséder l'acide aminé

hypusine, résidu qui par ailleurs est largement conservé chez les eucaryotes. L'hypusine résulte de la modification post-traductionnelle d'un résidu lysine, et est responsable de l'activation de eIF-5A. En effet, il a été montré que ce résidu est nécessaire pour la liaison de eIF-5A avec des composants de la machinerie traductionnelle, comme les ribosomes, les ARN de transfert (ARNt) ou les ARNm (Park, 1989). Cependant, des études chez la Levure *S. cerevisiae* ont montré que eIF-5A est essentielle à la viabilité cellulaire mais qu'elle n'est pas impliquée dans l'initiation de la traduction générale des protéines (Kang and Hershey, 1994). En effet, l'absence de eIF-5A provoque un arrêt rapide du cycle cellulaire, mais affecte peu la synthèse protéique. Par ailleurs, l'absence de formation de l'hypusine sur eIF-5A provoque la disparition des polysomes sur certains ARNm (Hanuske-Abel et al., 1995). Ainsi, eIF-5A semble avoir un rôle dans le métabolisme des ARNm cellulaires, en induisant la dégradation sélective de certains ARNm.

b.4) Les hélicases d'ARN DDX1 et DDX3

Des hélicases d'ARN ont été récemment identifiées comme intervenant dans le transport de l'exportosome. Les protéines DDX (*Asp-Glu-Ala-Asp* = *DEAD-box RNA helicase*) sont des hélicases d'ARN dépendantes de l'ATP, impliquées dans différents aspects du métabolisme des ARN, dont la transcription, l'épissage et l'export. Elles interviennent dans les réarrangements moléculaires, en induisant notamment le déroulement des hélices d'ARN pour la modulation des interactions ARN-ARN ou ARN-protéines.

Il a été montré que les protéines DDX3 et DDX1 sont deux co-facteurs essentiels à la localisation de Rev et au transport de l'ARNm viral vers le cytoplasme. En effet, DDX3 est une protéine nucléo-cytoplasmique capable d'interagir avec Rev et hCRM1 *in vivo* et localisée sur la face externe (cytoplasmique) des NPC (Yedavalli et al., 2004). De ce fait, DDX3 pourrait utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour dérouler l'ARNm viral et réduire certaines contraintes structurales afin de faciliter son passage à travers le NPC. Cette modification conformationnelle pourrait également contribuer au détachement des protéines présentes sur l'ARNm viral à son arrivée dans le cytoplasme.

Le rôle de DDX3 dans la cellule reste inconnu à l'heure actuelle, et il semble évident qu'il ne se limite pas à assister la réplication du HIV-1. Bien que DDX3 agisse d'une manière similaire à la protéine Dbp5, une hélicase de la même famille intervenant dans l'export des ARNm cellulaires, DDX3 n'intervient pas dans ce processus (Cullen, 2005).

Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré un lien entre la faible infectivité des astrocytes du système nerveux central (SNC) et la protéine DDX1. En effet, l'expression de DDX1 est très réduite dans les astrocytes du SNC, et Rev est majoritairement distribuée dans le cytoplasme de ces cellules (Fang et al., 2005). En conséquence, la fonction Rev est fortement limitée et seule l'expression des ARNm viraux multi-épissés est efficace. DDX1 semble se fixer sur la séquence NIS de Rev, ce qui permet à Rev de rester dans le noyau et de se fixer au RRE. En effet, le phénotype observé dans les astrocytes est similaire à celui observé avec des mutants de Rev délétés de leur NIS (Fang et al., 2002). En particulier, un mutant délété de quelques résidus dans le NIS montre une localisation diffuse à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Bien que capable de lier le RRE et de former des multimères, ce mutant est fonctionnellement inactif. Ces observations suggèrent l'intervention d'un facteur interagissant avec le NIS, comme DDX1, et important pour la répartition et la stabilité de Rev dans la cellule.

b.5) REBP et les microtubules

La protéine REBP (*Rev/Rex Effector Binding Protein*) a été également identifiée grâce au système de criblage par double hybride chez la Levure (Venkatesh et al., 2003). Lors de ce criblage, des mutants de Rev n'interagissant pas avec REBP sont incapables d'exporter les ARNm viraux contenant le RRE dans des cellules de mammifères. REBP présente environ 90% d'homologies avec la protéine KID (*microtubule-binding kinesin-like protein*), dérivée des cellules humaines du cancer du sein, et qui pourrait bien être un variant de REBP dans ces cellules tumorales. REBP n'est pas une protéine navette comme hCRM1 ou DDX3, mais elle reste confinée dans le noyau et à la périphérie intranucléaire. Par ailleurs, les kinésines sont impliquées dans le transport énergie-dépendant de nombreux substrats, en les véhiculant le long des microtubules de la cellule. Il est possible que REBP permette à Rev d'accéder à l'ARNm viral et le libérant de la matrice nucléaire vers le nucléoplasme soluble. REBP pourrait également servir d'adaptateur pour l'assemblage des multimères de Rev sur l'ARNm viral.

Par ailleurs, la partie amino-terminale de Rev présente des similarités de séquences avec les kinésines Kin I, impliquées dans la déstabilisation des microtubules. Des auteurs ont ainsi suggéré que Rev pourrait interagir avec la tubuline et induire la dépolymérisation du réseau microtubulaire, un scénario en accord avec la déstabilisation du cytosquelette observé lors d'une infection par HIV-1 (Watts et al., 2000).

b.6) La protéine Sam68

Plusieurs auteurs ont montré la participation de la protéine Sam68 (*Src-associated protein in mitosis*, *68 kDa*) dans la fonction Rev. En effet, il a été montré que cette protéine est capable de stimuler l'expression des protéines tardives du virus en l'absence de Rev (Reddy et al., 1999). Sam68 est capable de se lier au RRE ou à Rev *in vitro* et *in vivo*, et ce indépendamment l'un de l'autre. Elle peut substituer en partie la fonction Rev et agir en synergie avec Rev pour l'export des ARNm viraux. Par ailleurs, des mutants *trans*-dominants négatifs de Sam68 sont capables d'inhiber spécifiquement la fonction Rev et la réplication du HIV-1 (Reddy et al., 1999 ; Soros et al., 2001). En particulier, la délétion de sa partie carboxy-terminale, contenant un NLS, séquestre Sam68 Δ C dans le cytoplasme, qui retient alors Rev dans ce compartiment. Il est probable que l'interaction entre Rev et Sam68 masque le NLS de Rev, et que leur import au noyau nécessite le NLS de Sam68.

D'autres auteurs ont suggéré que ce même mutant pourrait retenir les ARNm viraux à la périphérie nucléaire dans le cytoplasme, les empêchant ainsi d'accéder à la machinerie traductionnelle (Soros et al., 2001). Sam68 n'étant pas une protéine navette, elle n'a pas d'effet direct sur la localisation de Rev. Par sa propriété de liaison à l'ARN et sa localisation nucléaire, il est plutôt probable qu'elle agisse directement sur les ARNm viraux contenant un RRE, pour faciliter leur transport du nucléoplasme vers les pores nucléaires. Cette activité de Sam68 en fait un homologue fonctionnel de Rev.

Cependant, d'autres auteurs ont montré que Sam68 s'associe avec Rev dans le noyau indépendamment du RRE et stimule son export (Li et al., 2002b). Ces travaux ont en effet indiqué que l'expression de Sam68 est réduite dans les astrocytes suite à l'infection par HIV-1, ce qui bloque la fonction Rev et affecte la réplication virale. L'apport exogène de Sam68 dans les cellules entraîne l'accumulation de Rev dans le cytoplasme, consécutive à son association avec Sam68. Sam68 est donc capable de lever l'inhibition de la fonction Rev dans les astrocytes, et de promouvoir l'export des ARNm viraux dépendants de Rev.

Par ailleurs, Sam68 est capable de se lier sur le RRE, mais sur une séquence différente de celle fixant Rev, et cette interaction n'est certainement pas essentielle à la fonction de Sam68 dans l'export médié par Rev. De plus, la Leptomycine B bloque Sam68 dans la membrane nucléaire et inhibe l'export de Rev dans le noyau. Il est donc probable que Sam68 s'associe à Rev dans le complexe nucléaire Rev/ARN/CRM1/RanGTP, et le dirige à proximité des pores nucléaires. L'interaction de l'exportosome avec les nucléoporines provoque alors sa translocation dans le cytoplasme et la dissociation de Sam68 dans le noyau (**Figure 30**) (Li et

al., 2002a). Enfin, des études très récentes ont montré que dans des cellules de mammifères déplétées complètement en Sam68, l'export des ARN dépendants de Rev et la production virale sont défectueux (Modem et al., 2005). Sam68 semble donc impliquée dans l'export des ARNm viraux dépendants de Rev, en agissant au niveau des pores nucléaires, via l'interaction directe avec Rev et d'autres composants des NPC.

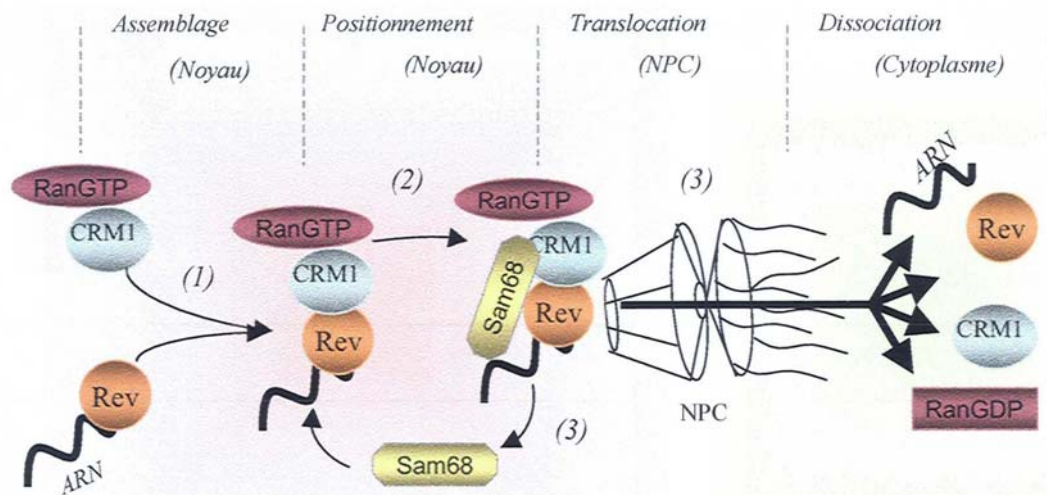


Figure 30 : Modèle de la fonction de Sam68 dans l'export des ARNm viraux dépendants de Rev.

(1) L'association du complexe Rev/ARN avec CRM1 et RanGTP forme le complexe d'export dans le noyau, indépendamment de Sam68. (2) Sam68 s'associe avec le complexe en se fixant à Rev et positionne le tout à proximité immédiate du pore nucléaire (NPC). (3) La translocation à travers le NPC est induite par diverses interactions entre des nucléoporines du NPC et le complexe d'export, et en particulier avec CRM1 et Rev. Sam68 est libéré dans le noyau avant la traversée du complexe d'export, qui sera dissocié dans le cytoplasme.

Sam68 est une protéine nucléaire se liant aux séquences ARN et capable de s'auto-associer grâce à un domaine KH (*K Homology domain*), retrouvé chez des protéines de liaison à l'ARN impliquées dans l'export des ARNm cellulaires, les hnRNP (*heterogenous nuclear Ribonucleoprotein*). Elle a été initialement identifiée comme un substrat spécifiquement recruté lors de la mitose par des tyrosine kinases Scr, ainsi que par la protéine kinase dépendante de la cycline, Cdc2. Elle est également capable de s'associer avec des protéines possédant un motif SH2 ou SH3. Cette association, conjointement avec sa phosphorylation par les kinases Scr ou Cdc2, pourrait réguler sa capacité de liaison sur l'ARN. Sam68 semble

ainsi participer aux voies de signalisation cellulaires impliquant les tyrosine kinases Src, et pourrait jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des ARN, comme l'épissage, l'export ou la traduction (Najib et al., 2005). D'autres auteurs ont également montré que Sam68 intervient dans la prolifération cellulaire, et qu'elle est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, lui suggérant un rôle en tant que suppresseur de tumeurs (Taylor et al., 2004). Sa régulation par les kinases ou par l'association avec d'autres protéines pourrait jouer un rôle dans ses propriétés pro-apoptotiques, et met un lien entre les voies de transduction de signal et le métabolisme des ARN.

b.7) Autres co-facteurs ?

Outre ces différentes protéines, Rev recrute probablement d'autres partenaires cellulaires pour exercer sa fonction sur les ARNm viraux non ou partiellement épissés. Les analyses par double hybride promettent l'identification de nouveaux modulateurs de l'activité de Rev. Ainsi, des auteurs ont récemment identifié la protéine 16.4.1 ou Risp1 (*Rev interacting shuttle protein 1*), qui effectue la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à CRM1 et semble réguler négativement la fonction Rev (Kramer-Hämmerle et al., 2005). A l'inverse, des auteurs ont très récemment montré que la protéine ATM (*Ataxia-Telangiectasia-Mutated*), impliquée dans la voie de réparation des dommages à l'ADN, a un effet positif sur la fonction Rev et stimule l'expression des gènes tardifs du HIV-1 (Ariumi and Trono, 2006). Ce rôle ne passe pas par une interaction directe avec Rev, mais plutôt par une stabilisation d'un co-facteur cellulaire de Rev ou par la séquestration d'un élément inhibiteur. La caractérisation biologique de l'ensemble des facteurs impliqués dans la fonction Rev permettra de détailler précisément le mécanisme d'action de Rev dans la phase tardive du virus, et de développer des stratégies thérapeutiques spécifiques.

III.2.6. Le cycle de transport nucléaire de Rev

Avant de décrire les étapes du cycle de transport nucléaire de Rev, je détaillerai succinctement les mécanismes de l'import et de l'export nucléaire dans la cellule. En effet, comme décrit dans le paragraphe précédent, Rev utilise plusieurs partenaires cellulaires impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique pour transporter les ARNm viraux non ou partiellement épissés de leur site de transcription jusqu'au cytoplasme (Love et al., 1998 ; Cullen, 2003 ; Dayton, 2004). Rev fait ainsi intervenir chaque protéine selon une organisation hiérarchique

précise, afin de diriger les ARNm viraux à l'écart des processus de maturation ou de dégradation cellulaire pour les envoyer au cytoplasme.

a) Le transport nucléaire dans la cellule (Figure 31)

La ségrégation spatiale entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique suppose des échanges intenses. En effet, toutes les protéines nucléaires, comme les protéines impliquées dans l'architecture du noyau, la régulation génique, la duplication ou la transcription sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent être importées dans le noyau. Inversement, les ARN messagers et les ARN de transfert sont synthétisés dans le noyau et doivent être exportés pour remplir leur fonction. Il en est de même pour d'autres petits ARN nucléaires impliqués dans l'épissage, et la formation des ribosomes nécessite également un transport bidirectionnel des différents constituants. Ces échanges entre noyau et cytoplasme s'effectuent au niveau de structures macromoléculaires appelées pores nucléaires (NPC). Ces pores permettent la diffusion passive de petites molécules jusqu'à 40 kDa ainsi que le transport actif et énergie-dépendant de particules pouvant atteindre des millions de dalton. L'analyse biochimique et génétique des NPC chez la Levure a conduit à l'identification de protéines appelées nucléoporines, formant de larges structures ouvertes de 125 MDa environ (Rout and Blobel, 1993 ; Fabre and Hurt, 1997). Parmi la cinquantaine de protéines qui constituent le NPC chez la Levure (Rout and Blobel, 1993), seules 30 protéines ont été identifiées à l'heure actuelle, et 15 chez les Vertébrés (Doye and Hurt, 1997 ; Strambio-de-Castillia et al., 1999) Ces nucléoporines possèdent pour la plupart une répétition du dipeptide phénylalanine-glycine ou répétition FG, et participent aux mouvements des substrats entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique de la cellule.

L'import vers le noyau fait intervenir des récepteurs nucléaires qui permettent à la molécule cargo d'atteindre le NPC et de se connecter aux nucléoporines qui émergent du côté cytoplasmique (Hurt, 1996 ; Ullman et al., 1997). Il s'agit principalement de l'importine β , également connue sous le nom de karyophérine β ou PTAC97, et qui forme un hétérodimère avec l'importine α . Cette dernière intervient dans la reconnaissance du NLS, alors que l'importine β s'associe au pore nucléaire et provoque l'import. Un autre type de récepteurs fixe directement la séquence NLS du substrat à importer. C'est le cas de la transportine, dont la séquence est intimement reliée à celle de l'importine β , mais qui est fonctionnellement

divergente. La transportine se fixe sur une séquence appelée M9, présente sur diverses protéines hnRNP, et les envoie au noyau sans l'intermédiaire d'une molécule équivalente à l'importine α .

D'autres co-facteurs importants s'assemblent stablement avec le substrat ou le récepteur. Parmi eux, la protéine RanGTPase joue deux fonctions bien distinctes dans l'import nucléaire. Tout d'abord, grâce à son activité d'hydrolyse du GTP, elle fournit une partie de l'énergie nécessaire à la translocation du cargo à travers le NPC. Par ailleurs, Ran crée une asymétrie entre les formes RanGTP et RanGDP de chaque côté de la membrane nucléaire, ce qui dirige les processus de transport entre le noyau et le cytoplasme. En effet, sous l'action des protéines cytoplasmiques RanGAP (*Ran GTPase Activating Protein*) et RanBP1 (*Ran Binding Protein 1*), le GTP est hydrolysé dans le cytoplasme, alors que l'échange du GDP en GTP n'a lieu que dans le noyau sous l'action du facteur RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*), qui est associé à la chromatine. Cette asymétrie contribue à la formation du complexe récepteur/substrat dans le cytoplasme et à sa dissociation dans le noyau. En effet, les récepteurs de l'import ont une haute affinité pour RanGTP présente uniquement dans le noyau, mais cette interaction est mutuellement exclusive avec la liaison du substrat à importer, ce qui le libère dans le noyau. De cette manière, Ran est également impliquée dans la dissociation de l'hétérodimère importine α/β , puisque la liaison de RanGTP avec l'importine β dans le noyau dissocie les deux monomères (Izaurre et al., 1997 ; Ullman et al., 1997).

L'export vers le cytoplasme de complexes macromoléculaires s'effectue également par les pores nucléaires. Dans le cas des ARN, ceux-ci sont en général associés à un ensemble de protéines pour former un large complexe ribonucléoprotéique (RNP) et qui fournissent le signal pour l'export de l'ARN (Cole et al., 1997 ; Stutz and Rosbash, 1998). Ces protéines sont probablement spécifiques de chaque type d'ARN, puisque l'export de chacun d'entre eux est individuellement saturable. L'identification de courtes séquences transférables et provoquant le transport actif et rapide de protéines spécifiques hors du noyau supporte cette hypothèse.

Parmi eux, le motif NES est très fréquemment rencontré sur des protéines impliquées dans le métabolisme des ARN, comme le facteur de transcription cellulaire TFIIIA (Fridell et al., 1996) et bien évidemment la protéine Rev. Le facteur TFIIIA intervient dans l'export de l'ARN 5S, en formant un complexe TFIIIA/ARN 5S qui pourra atteindre le cytoplasme. Il est

possible de remplacer fonctionnellement le NES de Rev par celui de TFIIA, et le NES de Rev bloque l'export médié par TFIIA. Cela suggère que Rev exploite la voie d'export cellulaire utilisée par les ARN 5S, qui est différente de celle des ARNm cellulaires.

D'autres séquences peuvent jouer le rôle de NES, mais les déterminants nécessaires pour leur fonction d'export ne sont pas encore bien définis. De la même manière que pour les motifs NLS, les séquences NES interagissent directement avec des récepteurs de l'export nucléaire. En particulier, la protéine CRM1/exportine 1 a été identifiée comme le récepteur d'export capable de reconnaître les NES de différentes protéines cellulaires et virales, dont MAPKK, PKI, I- κ B et Rev (Stade et al., 1997).

Par ailleurs, et d'une manière similaire que pour l'import, la protéine Ran participe au transport vers le cytoplasme. En effet, la forme RanGTP se lie sur le récepteur d'export dans le noyau pour permettre la formation du complexe récepteur/substrat, et le gradient GTP/GDP dirige le transport des complexes RNP (Izaurralde et al., 1997).

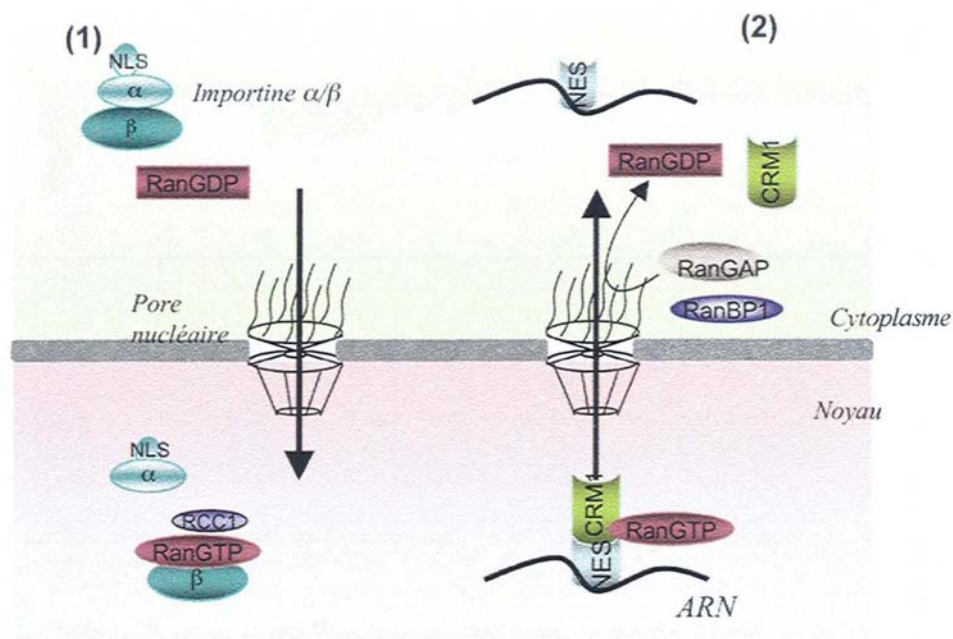


Figure 31 : Schéma simplifié du transport nucléaire dans la cellule.

L'import et l'export nucléaires de molécules ou de complexes moléculaires s'effectue à travers les pores nucléaires (NPC) et font intervenir différents facteurs.

(1) L'import nucléaire de protéines cargo possédant un NLS fait généralement intervenir le dimère importine α/β : l'importine α reconnaît le NLS et l'importine β dirige l'ensemble vers les NPC. Le gradient GDP/GTP dirige le transport jusqu'au noyau, et la protéine RanGTP présente dans le noyau dissocie le dimère d'importine α/β , ce qui libère le cargo dans le noyau.

(2) L'export nucléaire de molécules d'ARN fait intervenir des protéines qui s'associent sur l'oligonucléotide et possèdent un signal pour leur export. Parmi ceux-ci, le motif NES permet le recrutement du récepteur d'export CRM1 et de la protéine RanGTP. Le gradient GTP/GDP dirige alors le complexe à travers les pores nucléaires jusqu'au cytoplasme, où RanGDP provoque sa dissociation.

Les protéines RanGAP et RanBP1 sont responsables de l'hydrolyse du GTP en GDP dans le cytoplasme, tandis que le facteur RCC1 permet l'échange du GDP en GTP dans le noyau.

b) Le cycle de transport nucléaire de Rev (Figure 32)

Après sa traduction dans le cytoplasme, Rev utilise de multiples ressources disponibles dans la cellule pour être importée dans le noyau. En effet, grâce à son motif NLS, Rev est capable d'interagir directement avec l'importine β (Henderson and Percipalle, 1997). Ce complexe binaire ne nécessite par la présence de l'importine α , et sera dissocié dans le noyau par la

protéine RanGTP. Outre l'importine β , des études récentes ont montré que Rev est capable de se fixer sur d'autres récepteurs cellulaires de l'import, comme les importine 5 et 7 et la transportine (Arnold et al., 2006). Ainsi Rev, à l'image des certaines protéines histones et des protéines ribosomiques, exploite plusieurs voies d'import nucléaires pour pénétrer efficacement dans le noyau et les nucléoles (Rout et al., 1997).

Suite à sa translocation dans le noyau, la protéine RanGTP induit la dissociation du complexe récepteur/Rev et libère Rev dans le nucléoplasme. Par ailleurs, Rev semble utiliser les fonctions de la protéine B23 pour optimiser son import jusque vers les nucléoles. Une fois dans le noyau, Rev s'associe aux ARNm nouvellement issus de la transcription et contenant le RRE, par l'interaction directe entre son motif ARM et le site de reconnaissance de haute affinité sur le RRE. Le signal spatio-temporel induisant le recrutement de Rev sur ces ARNm dans le noyau n'est pas encore bien défini, mais il implique probablement la participation de facteurs d'épissage qui retiennent ces ARNm dans le noyau et empêchent leur dégradation.

La formation du complexe Rev/RRE induit la fixation d'autres molécules Rev sur l'ARNm, ce qui expose les séquences NES. Le complexe multimérique protège et stabilise l'ARN, et permet le recrutement de facteurs cellulaires dont hCRM1 et RanGTP. L'association de multiples molécules de Rev et hCRM1 sur l'ARN semble en effet promouvoir la dissociation des facteurs d'épissage ou d'autres facteurs de rétention nucléaire, tout en dirigeant l'ensemble vers les pores nucléaires. Bien que majoritairement cytoplasmique, l'hélicase DDX3 semble également faire partie du complexe nucléaire, et restructure l'ARNm pour son passage à travers les NPC. Par ailleurs, il semblerait que le facteur eIF-5A soit également recruté sur le complexe RNP avant son passage dans le cytoplasme.

L'exportasome, constitué de la molécule d'ARNm viral associée aux protéines Rev, RanGTP, hCRM1, DDX3 et probablement eIF-5A, va alors être transporté de la phase soluble du noyau vers les pores nucléaires. Plusieurs protéines participent à ce mouvement, dont les nucléoporines Nup98 et Nup214 et la protéine Sam68, qui seront libérées dans le noyau dès lors que l'exportasome s'achemine dans la lumière du pore nucléaire.

La progression de l'exportasome dans le pore nucléaire s'effectue par des interactions entre Rev et divers composants des NPC, dont les protéines Nup 153, hRip/Rab et NLP-1, qui lui permettent d'être libéré dans le cytoplasme.

Par sa liaison avec le NES de Rev, le facteur hCRM1 est fortement impliqué dans la translocation de l'exportasome à travers les pores nucléaires, en permettant le recrutement des acteurs de l'export nucléaire sur le complexe. Par ailleurs, en présence de Leptomycine B, les complexes liés à Rev s'accumulent dans le nucléoplasme et au niveau des NPC (Cmarko et al., 2002). Ces observations sont le résultat de la modification chimique de hCRM1 par la LMB, qui pourrait empêcher son association correcte avec Rev.

Une fois dans le cytoplasme, le complexe est dissocié, libérant à la fois l'ARNm, les protéines Rev qui pourront retourner au noyau, et les facteurs d'export cellulaire dont hCRM1. Les protéines RanBP1 et RanGAP permettent l'hydrolyse du GTP en GDP, responsable de la libération de hCRM1 qui pourra être reconduit au noyau. L'affinité de Rev pour l'ARNm viral est très forte, et leur dissociation fait probablement intervenir un autre événement comme la liaison des ribosomes pour la traduction de l'ARNm, ou le recrutement de protéines virales pour l'assemblage des nouveaux virions. Elle semble également facilitée par l'activité de DDX3 qui induit des modifications conformationnelles de l'ARNm.

La dissociation de Rev et de l'ARNm viral rend accessible le NLS de Rev qui peut de nouveau se lier à l'importine β et être ré-importée dans le noyau, où elle pourra de nouveau se fixer sur les ARNm viraux (Henderson and Percipalle, 1997).

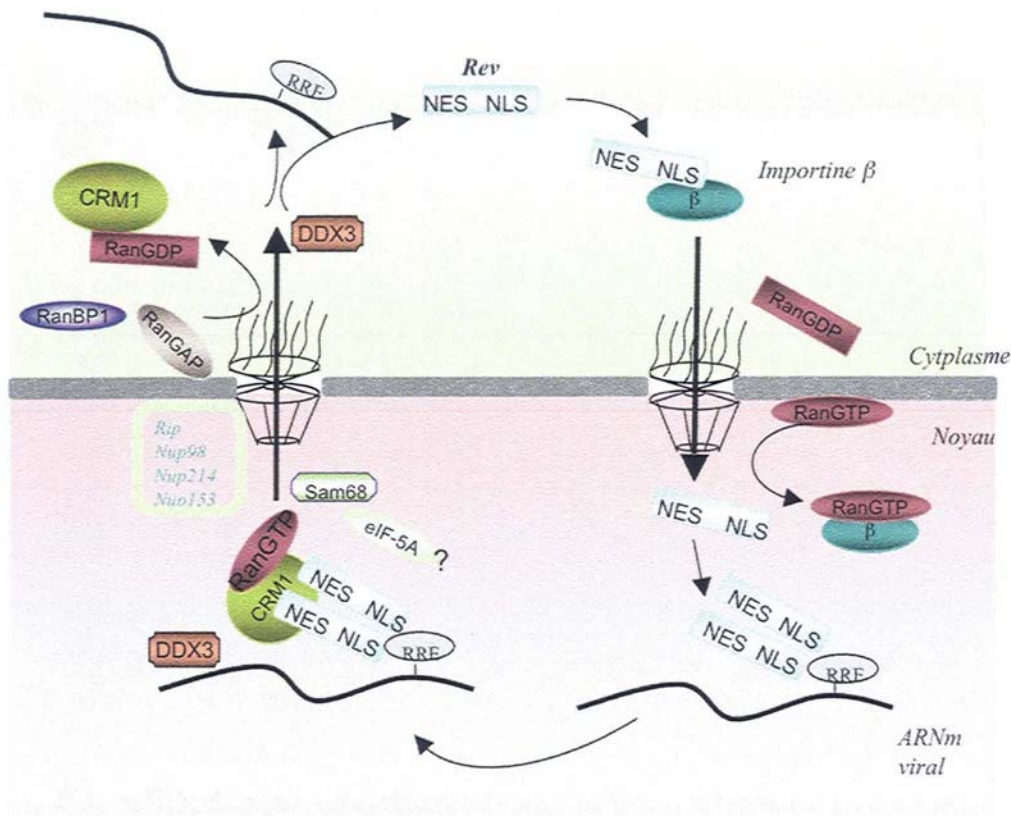


Figure 32 : Le cycle de transport de Rev.

Ce schéma décrit les principales étapes du cycle de transport de Rev entre le noyau et le cytoplasme, pour promouvoir l'export des ARNm viraux non ou partiellement épissés. Sommairement, Rev se lie grâce à sa séquence NLS sur des récepteurs d'import dont l'importine β pour atteindre le noyau. Elle est dissociée de ce récepteur sous l'action de RanGTP, et fixe le RRE via sa séquence riche en arginine (dont le NLS fait partie). Rev s'assemble sous forme d'oligomères, puis recrute le facteur d'export CRM1. Le complexe sera dirigé vers les pores nucléaires puis jusqu'au cytoplasme, sous l'action de Sam68 et de nombreuses nucléoporines dont Nup98, Nup153, Nup214 et Rip. Le facteur eIF-5A semble intervenir dans le complexe nucléaire, pour stimuler le passage à travers les NPC. L'hélicase d'ARN DDX3 intervient dans le noyau probablement pour remodeler l'ARN et faciliter son passage à travers le NPC. Le complexe est dissocié dans le cytoplasme sous l'action de RanBP1 et RanGAP qui induisent l'hydrolyse du GTP en GDP et libèrent CRM1. Rev se dissocie de l'ARN, probablement aidée par DDX3, et peut de nouveau être recruté sur l'importine β .

Le cycle de transport nucléaire des ARNm viraux médié par Rev rappelle évidemment celui des ARNm cellulaires eucaryotes, qui une fois maturés sortent du noyau pour être traduits en protéines dans le cytoplasme (Cullen, 2005) (**Figure 33**). En effet, bien que les acteurs de l'export de ces deux types d'ARNm soient différents et que chacune de ces voies d'export soient complètement indépendantes l'une de l'autre, les mécanismes mis en jeu sont étonnamment similaires. Ainsi, alors que les ARNm cellulaires interagissent avec les facteurs

d'export TAP (*Transport Activating Protein*) et Nxt1 (*NXF-related export protein, NXF : Nuclear Export Factor*), l'ARNm viral lié à Rev est associé à hCRM1. De la même manière, une hélicase d'ARN de la même famille (*DEAD-box helicases*) est recrutée sur chaque type d'ARNm, Dbp5 pour les ARNm cellulaires et DDX3 pour les ARNm viraux. Ainsi, en exploitant les mécanismes de régulation de l'expression des gènes cellulaires et les multiples possibilités de transport, le virus HIV-1 rend possible l'expression de ses neuf gènes à partir d'une seule entité génomique, et la production de particules virales infectieuses qui pourront disséminer l'infection.

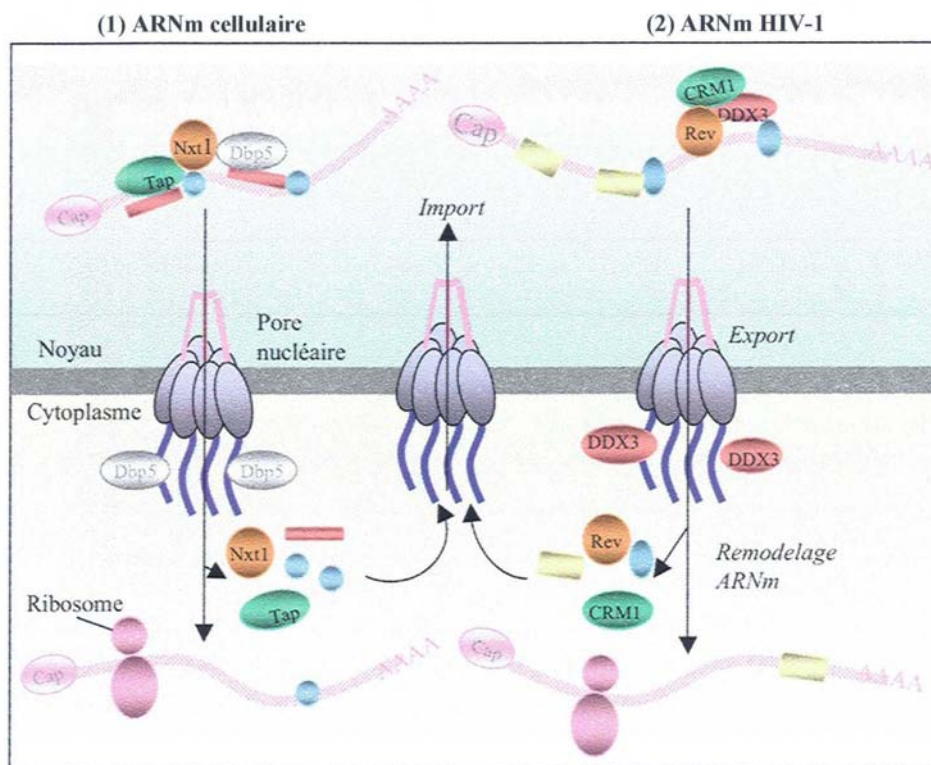


Figure 33 : Mécanisme d'export des ARNm cellulaires et des ARNm du HIV-1.

(1) L'export des ARNm cellulaires fait intervenir le facteur d'export Tap/Nxt1 et l'hélicase d'ARN Dbp5. Cette dernière participe également à la translocation à travers le pore nucléaire et au remodelage de l'ARNm dans le cytoplasme. (2) Selon un scénario similaire, l'export des ARNm viraux dépendants de Rev implique le facteur d'export CRM1 et l'hélicase d'ARN DDX3. L'ensemble de ces facteurs est, pour chaque type d'ARNm, redirigé vers le noyau à travers les pores nucléaires pour être de nouveau recrutés sur les ARNm.

D'après Cullen, 2005.

III.2.7. Rev et la pathogénèse du HIV-1

La présence au sein de la cellule infectée d'un cycle de transport des ARNm viraux dirigé par Rev est essentielle pour la réplication du HIV-1 et sa pathogénèse. En effet, comme expliqué précédemment, l'activité de Rev implique un déroulement de l'expression des gènes viraux en deux phases. Ainsi, en présence d'une faible concentration de protéines Rev, la formation de complexes multimériques Rev/RRE est basse. L'export et la traduction des ARNm non complètement épissés sont limités, alors que les ARNm multi-épissés sont activement traduits en protéines, dont Rev. Celle-ci s'accumule alors dans la cellule jusqu'à une concentration limite, qui déclenchera la synthèse des protéines tardives du virus.

La fixation successive de molécules de Rev le long des ARNm viraux pourrait également expliquer l'apparition décalée dans le temps des différents ARNm dans le cytoplasme. En effet, on peut imaginer que le recouvrement par Rev des ARNm mono-épissés est plus rapide que celui des ARN non épissés et donc de plus grande taille, ces derniers étant alors traduits plus tardivement (Heaphy et al., 1991).

L'activité de Rev semble ainsi responsable du délai de l'expression des antigènes viraux (principalement Gag et Env) dans les cellules infectées, qui échappent temporairement à la réponse immunitaire. En effet, l'absence de fonction Rev « retarde » la présentation des antigènes viraux à la surface des cellules infectées, en limitant l'expression des protéines tardives, alors que se poursuit la production des protéines virales précoces, dont Nef qui réduit l'expression des molécules du MHC-I. Par ailleurs, il a été constaté que l'activité Rev chez les patients atteints du SIDA était plus élevée que chez des personnes asymptomatiques. Cela suppose qu'il existe des formes atténuées de Rev, qui limitent la concentration des épitopes Gag à la surface des cellules infectées tout en augmentant l'activité de Nef. Cette activité limitée de Rev contribuerait à la protection des cellules infectées contre l'action des lymphocytes T cytotoxiques, permettant une multiplication maximale du virus dans les cellules (Bobbitt et al., 2003).

Enfin, il est possible que Rev joue un rôle dans la latence du virus, puisqu'en concentration réduite de Rev dans la cellule, l'export des ARNm viraux est extrêmement limité. L'arrêt simultané des processus de transcription, dans certaines conditions non favorables à la cellule, pourrait permettre l'établissement de la latence provirale.

III.2.8. Inhibition de la fonction Rev

Le rôle spécifique et essentiel de Rev dans la réplication du HIV-1 en fait un candidat de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques. Dans la majorité des cas, celles-ci cherchent à introduire dans les cellules une molécule pour induire l'inhibition d'une ou plusieurs fonctions virales, et empêcher ainsi une multiplication accrue du virus. Ces techniques, rassemblées sous le nom « d'immunisation intracellulaire », permettent de rendre les cellules résistantes à l'infection virale. Elles peuvent être basées sur l'utilisation de molécules protéiques, comme l'introduction de mutants *trans*-dominants négatifs de Rev ou de l'un de ses co-facteurs cellulaires, ou sur leur déplétion massive dans les cellules. Les méthodes s'appuyant sur des molécules ARN utilisent notamment des polyribonucléotides capables de cliver spécifiquement les séquences RRE, ou reconnaissant Rev pour la détourner de ses véritables cibles virales.

a) Stratégies ciblant Rev ou un partenaire cellulaire

Plusieurs approches protéiques ont d'ores et déjà été développées, sans toutefois obtenir le succès attendu. Les protéines exogènes se révèlent souvent immunogènes, ou leur production dans les cellules est inefficace. Par ailleurs, ces stratégies se heurtent à des problèmes de spécificité d'action, car les protéines introduites sont susceptibles d'interférer avec les fonctions cellulaires. C'est le cas notamment des approches visant à empêcher l'action du motif NES de Rev, et qui bloqueraient également la voie d'export nucléaire médiée par hCRM1. Cette dernière étant également utilisée par des protéines cellulaires, intervenir sur ce processus s'avèrerait toxique pour les cellules. De plus, l'émergence de virus résistants aux traitements antirétroviraux est un problème récurrent lorsqu'une protéine virale est directement ciblée, puisque le virus est capable de s'adapter aux changements d'environnement par des mutations dans son génome. Le ciblage de facteurs cellulaires impliqués dans la fonction Rev offre une alternative attractive pour l'inactivation de Rev, puisque la probabilité d'émergence de mutants résistants à ces gènes cellulaires est beaucoup plus faible.

Parmi les approches protéiques, l'inhibition directe et ciblée de la protéine Rev a depuis longtemps été étudiée, notamment par l'introduction par transfert de gène d'un mutant *trans*-dominant négatif dans les cellules (Bevec et al., 1992). En effet, plusieurs travaux ont montré

l'efficacité et la spécificité de mutants dominants négatifs de la protéine Rev dans l'inhibition de la réplication du HIV-1. En particulier, la protéine RevM10 est capable de se fixer au RRE et à d'autres protéines Rev sauvages ou mutantes, et montre un phénotype dominant négatif en *trans*. L'introduction de cette protéine RevM10 dans des lymphocytes CD4+ périphériques d'un individu infecté par le HIV-1 confère à ces cellules un avantage de survie par rapport à des cellules traitées avec un vecteur contrôle (Bevec et al., 1992 ; Woffendin et al., 1996). Cette protection semble imputée au défaut de réplication virale dans les cellules exprimant RevM10 ainsi qu'à un délai dans la synthèse des protéines virales, ce qui retarde leur reconnaissance et leur élimination par la réponse immunitaire.

Plus récemment, la technique d'ARN interférence a été appliquée pour supprimer l'activité de Rev. Ainsi, des auteurs ont montré en 2002 qu'il est possible de bloquer spécifiquement la production de Rev grâce à des siRNA spécifiques de la séquence codant pour la protéine (Lee et al., 2002 ; Coburn and Cullen, 2002). Ces siRNA provoquent l'inhibition de la fonction Rev suite à la dégradation spécifique du gène cible *rev*. Conjointement avec des siRNA spécifiques de la séquence codant pour Tat, ils inhibent efficacement la réplication virale dans des cellules T primaires ou immortalisées (Coburn and Cullen, 2002).

D'autres approches de thérapie génique ont essayé de séquestrer Rev pour l'empêcher d'atteindre sa cible ARN spécifique. En particulier, des fragments de chaîne variables d'anticorps spécifiques de Rev (scFv) ont été utilisés pour bloquer son action (Duan et al., 1994). Ces morceaux d'anticorps très spécifiques antagonisent efficacement la fonction Rev, en séquestrant la protéine dans le cytoplasme. Par ailleurs, ces chaînes d'anticorps sont dirigées contre le domaine effecteur de Rev, contenant le NES, et il est probable qu'elles empêchent l'association de Rev avec l'un de ses co-facteurs cellulaires. L'introduction de ce type de molécules dans les cellules est efficace, très peu immunogène du fait de leur petite taille, et non toxique. Par ailleurs, ces molécules sont capables de se lier à de courtes séquences virales hautement conservées, et peuvent donc agir de manière très spécifique.

En parallèle de ces études visant à inhiber directement la fonction Rev, plusieurs auteurs ont cherché à introduire une forme mutée d'un de ses partenaires cellulaires. En particulier, des auteurs ont identifié des mutants de la protéine eIF-5A humaine incapables de compléter l'absence de son homologue Hyp2 chez *S. cerevisiae*, et qui empêchent de ce fait la croissance cellulaire (Bevec et al., 1996). L'analyse par immunofluorescence de noyaux de

cellules contenant Rev et ces formes mutées de eIF-5A a montré la rétention de Rev dans le compartiment nucléaire. Ces mutants dominants négatifs de eIF-5A semblent fixer correctement le complexe Rev/RRE, mais sont incapables de recruter les facteurs d'export nécessaires au passage à travers les pores nucléaires. Par ailleurs, l'expression constitutive de tels mutants ne serait pas toxique pour la cellule, bien que eIF-5A possède certainement d'autres partenaires dans la cellule qui pourraient être affectés.

Des travaux très récents ont proposé un inhibiteur chimique de eIF-5A, alors testé en phase II pour le traitement de la maladie de Crohn, pour l'inhibition de la réplication du HIV-1 (Hauber et al., 2005). Ce composé CNI-1493 est un inhibiteur d'une des enzymes responsables de la génération de l'acide aminé hypusine essentiel à l'activité de eIF-5A, la DHS (*désoxyhypusine synthase*). Contrairement à d'autres inhibiteurs de la DHS déjà identifiés par criblage informatique, CNI-1493 ne montre pas d'effets cytotoxiques dans les doses permettant la suppression de la réplication du HIV-1. Par ailleurs, la réplication de certains isolats de HIV-1 résistants aux traitements antiviraux classiques est sensible à CNI-1493. Ce genre de composé chimique représente une nouvelle catégorie de substances antirétrovirale, qui pourrait notamment permettre la suppression des virus résistants aux autres traitements.

De la même manière, des auteurs ont récemment étudié la possibilité de dépléter les cellules en protéine hRip, pour inhiber la réplication du HIV-1 dans des lignées cellulaires épithéliales ou lymphoïdes ainsi que dans des macrophages (Yu et al., 2005). L'ablation de hRip dans les cellules par RNA interférence ou par l'introduction d'un mutant dominant négatif semble effectivement inhiber la réplication virale, en retenant les ARNm viraux associés à Rev à la périphérie du noyau. hRip n'étant pas nécessaire à la viabilité cellulaire, elle pourrait devenir une cible attractive pour le développement de stratégies antirétrovirales.

b) Stratégies bloquant l'interaction Rev/RRE

Outre ces stratégies protéiques, il semble plus attractif en terme de spécificité d'action d'intervenir au niveau de la liaison de Rev avec son élément cible sur l'ARN, le RRE. En effet, le très haut degré de conservation de cette séquence RRE permet le développement d'inhibiteurs spécifiques et limite la probabilité d'émergence de mutations compensatrices sur l'ARN viral, qui affecteraient la fixation de Rev tout comme celle de l'inhibiteur. Par ailleurs,

intervenir au niveau de l'interaction Rev/RRE n'affecte pas d'autres facteurs cellulaires, et ne pose *à priori* pas de problème de cytotoxicité.

Il a été montré par exemple que des antibiotiques aminoglycosés et des composés aromatiques hétérocycliques inhibent l'interaction Rev/RRE *in vitro*, et réduisent l'expression des gènes de structure du HIV-1 dans des cultures cellulaires (Zapp et al., 1993 ; Zapp et al., 1997). En effet, certaines molécules aminoglycosées, comme la néomycine B ou la tobramycine, bloquent de manière compétitive la liaison de Rev sur le RRE, et inhibent la fonction Rev *in vitro* et *in vivo*. Des hétérocycles aromatiques agissent d'une manière similaire et se lient sur des régions précises du RRE avec une affinité relativement élevée, ce qui réduit les quantités nécessaires pour une inhibition correcte de la fonction Rev. Cependant, malgré leur spécificité, l'utilisation des composés aminoglycosés souffre d'un manque de perméabilité cellulaire qui limite leur usage thérapeutique. L'optimisation de ces molécules pourrait permettre d'établir des composés hautement sélectifs de régions spécifiques du RRE. Dans cet objectif, certains auteurs ont généré des variants de la néomycine conjugués à des séquences polyarginine et/ou à un cycle aromatique, afin d'augmenter l'affinité pour l'ARN (Hamasaki and Ueno, 2001). De telles molécules se lient en plusieurs exemplaires sur le RRE, grâce à des liaisons multiples de type électrostatique ou hydrogène, et avec une très forte affinité approchant celle de la protéine Rev elle-même.

Une autre stratégie se base sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens, dirigés contre le RRE. En effet, de courtes séquences ADN capables de se lier spécifiquement au RRE *in vitro* ont été identifiées. Celles-ci empêchent la fixation de Rev sur l'ARNm viral et déstabilisent les complexes Rev/RRE (Chin, 1992). Ces oligonucléotides altèrent la structure secondaire du RRE, ce qui bloque la fixation du premier monomère de Rev ou des suivants. De cette manière, ils empêchent à la fois la formation de nouveaux complexes Rev/RRE et la maturation des complexes multimoléculaires qui doivent être exportés. D'autres auteurs ont utilisé cette approche, en modifiant chimiquement la molécule ADN afin d'améliorer sa stabilité intracellulaire (Li et al., 1993). Ainsi, des oligonucléotides dirigés contre différentes régions du RRE et modifiées par un groupement phosphorothioate inhibent la fonction Rev de manière considérable dans des tests *in vitro*, et en particulier des ADN complémentaires du domaine II du RRE. Un traitement répété avec l'une de ces molécules supprime de manière persistante la réplication virale, sans provoquer de cytotoxicité pour les cellules. Toutefois, et à l'image d'autres molécules oligonucléotidiques, l'introduction de ces molécules antisens

dans la cellule reste un problème majeur. Par ailleurs, ces molécules ciblent des structures secondaires et tertiaires, et donc très spécifiques, et leur reconnaissance peut être problématique.

Une autre approche utilise des copies stables du RRE, appelées « *ARN decoys* », pour capturer Rev dans les nucléoles avant qu'elle ne fixe les véritables séquences RRE des ARNm viraux (**Figure 34**). En particulier, des auteurs ont généré des séquences ARN formées de 13 nucléotides correspondant au site ARN de très haute affinité pour Rev, la tige-boucle IID du RRE (Lee et al., 1994). Cette structure, correspondant au site minimal de liaison de Rev, est très conservée parmi les isolats de HIV-1, et est évidemment très spécifique de Rev. Ce système de « leurre moléculaire » est très efficace pour détourner spécifiquement Rev de ses cibles ARN virales, à l'image des molécules TAR capables d'inhiber la fonction Tat. Par ailleurs, cette stratégie est beaucoup moins affectée par la variabilité du HIV-1, puisque les séquences RRE et TAR sont hautement conservées, et que des mutations dans Rev ou Tat qui empêcheraient la liaison des ARN leurres bloqueraient également la fixation des séquences ARN virales.

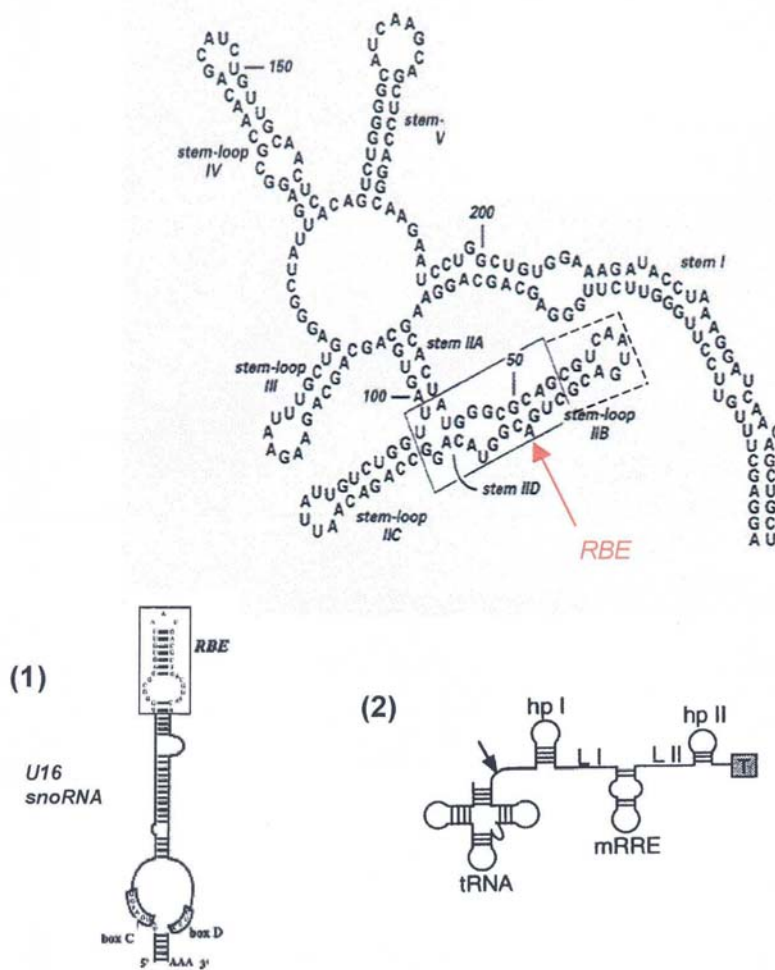


Figure 34 : Inhibition de l'interaction Rev / RRE par des ARN leurres.

Des molécules d'ARN correspondant au site minimal de liaison à Rev (*Rev Binding Element, RBE*) dans le RRE, représenté sur la figure du haut, ont été utilisées pour créer des leurres permettant de dévier Rev de ses véritables cibles virales. Deux exemples de molécules décrits ici dans la littérature sont représentés dans les figures (1) et (2).

(1) Buonomo et ses collaborateurs ont créé un ARN très court correspondant au domaine IID/IIB complet (RBE), fusionné à la séquence du petit ARN nucléolaire U16 snoRNA qui permet à la molécule d'atteindre les nucléoles, où sont accumulés les véritables RRE (*Buonomo et al., 1999*).

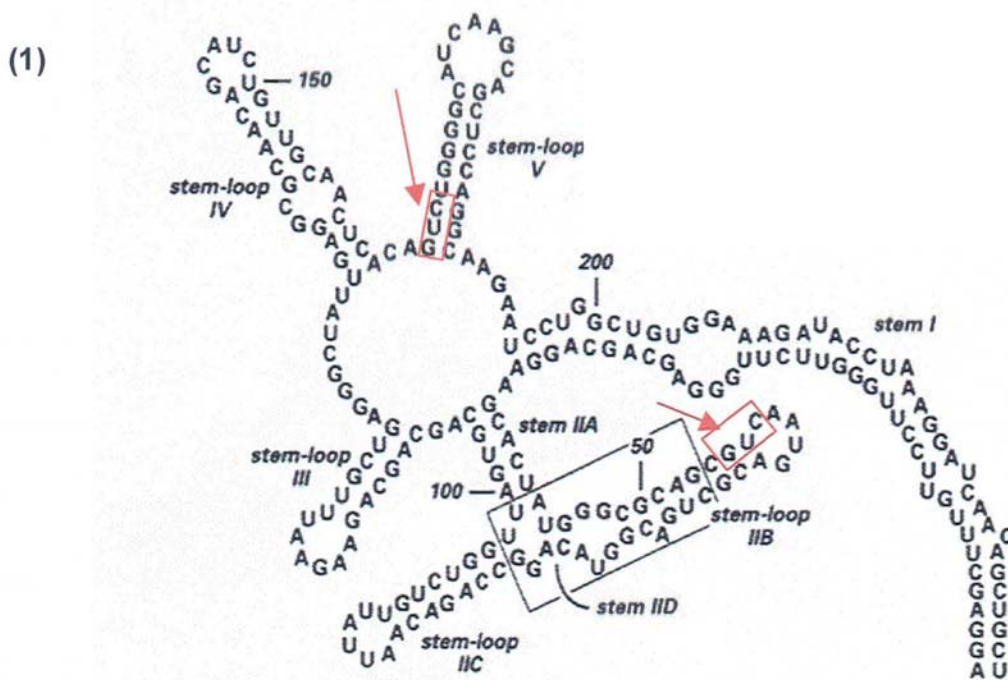
(2) Lee et ses collaborateurs ont créé des molécules chimériques possédant le domaine IID, auquel sont ajoutés quelques nucléotides pour imiter la boucle présente dans le RBE. Ce RRE minimal (mRRE) est entouré de plusieurs séquences dont un ARNt contenant un site d'épissage (flèche), permettant son élimination lors de la maturation du transcrit, et des structures en tige-boucle (hp I et hp II) séparées par quelques nucléotides (L I et L II), afin de stabiliser la structure finale (*Lee et al., 1994*).

Cette technique a de nouveau été testée en créant un ARN chimère constitué du domaine de liaison hautement spécifique de Rev sur le RRE (*Rev Binding Element*) et de la séquence de l'ARN nucléolaire U16 (snoRNA) (Buonomo et al., 1999). Par des expériences de microinjection d'oocytes de *Xenopus*, ces auteurs ont montré que la chimère U16-RBE

s'accumule efficacement dans les nucléoles, grâce à la séquence U16. Rev s'associe alors à U16-RBE dans les nucléoles et va sortir du noyau ainsi chargée, laissant ses véritables cibles ARN dans le compartiment nucléaire. Ces travaux ont par ailleurs soulevé l'idée que Rev passe par les nucléoles pour exercer sa fonction de liaison et d'export des ARN.

Très récemment, des auteurs ont montré que des cellules T et des monocytes exprimant de manière stable ce type de molécule U16-RBE sont résistantes à l'infection par HIV-1 (Michienzi et al., 2006). Cette petite séquence ARN semble un candidat thérapeutique potentiel, qui peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres ARN antiviraux. Cependant, les séquences ARN sont très instables dans les cellules, et leur introduction ainsi que leur synthèse dans les cellules est généralement inefficace. Cela implique l'utilisation de fortes doses intracellulaires, avec la probabilité d'effets secondaires importants.

Plusieurs auteurs ont utilisé le concept des ribozymes pour cibler spécifiquement le RRE, en introduisant des séquences antisens complémentaires du RRE. En effet, les ribozymes ciblent préférentiellement les triplets GUC, qui sont rencontrés dans la séquence RRE (**Figure 35**). Certains auteurs ont par ailleurs utilisé la séquence U16 pour diriger efficacement des ribozymes dirigés contre la région U5 du génome du HIV-1 dans les nucléoles, par où passent furtivement les ARNm viraux (Michienzi et al., 2000). Ces molécules chimères doivent ainsi cliver les ARNm viraux non ou mono-épissés, sur lesquels est présente la région U5. L'expression stable de ce type de molécules dans des lignées lymphoïdes ou épithéliales rend les cellules hautement résistantes à l'infection virale. Ces travaux ont par ailleurs soulevé l'idée d'un passage des ARN viraux dans les nucléoles, où ils pourraient subir des modifications pour pouvoir ensuite être correctement dirigés vers le cytoplasme.



(2)

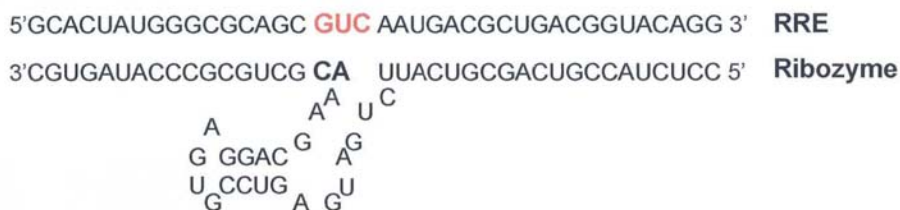


Figure 35 : Inhibition de la liaison de Rev sur le RRE par des ribozymes.

Les ribozymes sont des petits ARN capables de cliver des séquences ribonucléiques, en particulier au niveau des triplets GUC. (1) Cette approche a été utilisée pour cibler spécifiquement les triplets GUC présentes dans la séquence du RRE, dont certains exemples sont entourés en rouge. (2) Les ribozymes s'associent au RRE par complémentarité, et contiennent un site catalytique qui se retrouve à proximité du triplet GUC.

D'après Duan et al., 1997.

Plus récemment, des auteurs ont développé des molécules combinant le domaine de Rev se liant au RRE à des ions métalliques catalytiques (Jin and Cowan, 2005). Ces complexes métallo-peptidiques sont capables d'induire le clivage spécifique du RRE dans des conditions physiologiques et en présence d'un agent oxydant. Cette technique présente un avantage de spécificité par le ciblage du RRE, tout en maintenant une durée de vie correcte de la molécule par rapport aux composés ARN.

La combinaison des deux approches de thérapie génique, protéique et ribonucléotidique, semble également intéressante puisqu'elle pourrait réguler la réplication du virus à deux niveaux. Certains auteurs ont par exemple tenté de cibler à la fois le RRE par la technique des ribozymes, et la protéine Rev par l'utilisation de chaînes d'anticorps SFv (Duan et al., 1997). L'usage simultané des deux méthodes semble pouvoir renforcer l'efficacité de chacune, et bloquer la réplication du virus lors d'une infection aiguë ou chronique. En effet, la multimérisation de Rev sur le RRE *in vivo* forme très certainement un obstacle pour l'accès des ribozymes sur l'ARN. La présence de SFv, qui séquestrent Rev dans le cytoplasme et réduisent la durée de vie intracellulaire de Rev, pourrait empêcher Rev de se fixer efficacement sur l'ARN et permettre aux ribozymes d'accéder au RRE. Bien que d'une efficacité modestement améliorée contre la réplication virale, la combinaison de ces deux approches semble un moyen de prévenir l'émergence de mutants du virus dans le long terme de l'infection.

IV. Problématique du travail de thèse

IV.1. Inhibition de la fonction Rev par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire

Dans l'objectif de développer des inhibiteurs thérapeutiques spécifiques des fonctions Tat et Rev, le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon travail de thèse a élaboré une stratégie qui a permis de créer des molécules peptidiques capables d'inhiber efficacement la réplication virale (Roisin et al., 2004). En effet, la petite taille de ces deux protéines virales ainsi que leur capacité à former des complexes multimoléculaires suggère la possibilité d'établir des ligands compétitifs, interférant avec les interactions dans lesquelles elles sont impliquées.

Ainsi, par un criblage en double hybride chez la Levure, de courtes séquences peptidiques capables d'interagir spécifiquement avec Tat ou Rev ont été identifiées. Pour ce criblage, les séquences complètes de Tat et de Rev ou le domaine NES de Rev (résidus 70 à 96) ont été utilisées comme appâts, et des séquences aléatoires de 7 acides aminés couplées à une séquence de pénétration ont servi de proies. En effet, le domaine de transduction de la protéine virale Tat a été ajouté aux séquences criblées, dans la perspective de pouvoir ensuite les libérer directement dans le milieu intracellulaire. Cette propriété de transduction a été définie sur plusieurs protéines, dont Tat, en tant que PTD (*Protein Transduction Domain*) (Frankel and Pabo, 1988).

De cette manière, plusieurs séquences heptapeptidiques liées au domaine basique de Tat ont été identifiées, qui sont capables d'interagir avec les protéines Tat ou Rev dans la Levure ainsi que dans des cellules de mammifères.

Des tests fonctionnels réalisés dans des cellules de mammifères ont permis d'établir la capacité inhibitrice des heptapeptides identifiés sur leur protéine virale respective. Afin de limiter l'instabilité intracellulaire des peptides, la protéine SUMO-1 mutée au niveau du motif diglycine carboxy-terminal a été ajoutée, d'où leur dénomination de SHP pour « *SUMO-1 Heptapeptide Protein transduction domain* ». Enfin, l'épitope Flag a été ajouté à l'extrémité amino-terminale des molécules lors des tests d'interaction en cellules mammifères, afin de

simplifier par la suite les étapes de purification pour la production des protéines recombinantes. (**Figure 36 (1)**).

Les tests de *trans*-activation du promoteur du HIV-1 par Tat ont révélé que les différents SHP dirigés contre cette protéine (*SHP against Tat*, *SHPT*) n'ont pas d'effet pertinent sur l'activité de Tat dans les cellules. A l'inverse, deux SHPR (*SHP against Rev*), les SHPR142 et 190, inhibent efficacement l'expression d'un gène rapporteur contenant le RRE.

Des expériences d'interaction ont montré que ces deux SHPR interagissent directement avec la protéine Rev *in vitro*. Par ailleurs, il a été montré que dans les conditions d'inhibition de Rev précédemment déterminées, ces SHPR peuvent persister stablement dans le milieu extracellulaire et sont capables de pénétrer dans des cellules mononuclées issues d'échantillons sanguins.

Enfin, des tests sur la réplication virale dans le même type de cellules ainsi que dans des macrophages ont montré que les deux SHPR inhibent d'une manière relativement efficace la réplication virale, à des doses de l'ordre du micromolaire et sans effet cytotoxique (**Figure 36 (2)**).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, ces deux molécules représentent un intérêt majeur pour de futures investigations, puisqu'elles sont capables de réduire efficacement la réplication virale dans les deux types cellulaires majoritairement ciblés par le HIV-1, à savoir les lymphocytes CD4⁺ et les macrophages.

Durant ma thèse, j'ai donc entrepris de nombreux travaux dans l'objectif d'optimiser l'efficacité de ces molécules, afin de permettre leur éventuelle utilisation thérapeutique. J'ai ainsi dirigé mes recherches selon deux axes principaux, à savoir :

- la compréhension des mécanismes d'action des molécules SHPR, à travers l'étude de leur rôle sur les principales étapes intervenant dans la fonction Rev.
- l'optimisation des propriétés du SHPR190, qui est la molécule inhibitrice identifiée la plus puissante, en étudiant l'effet de différentes mutations de la séquence initiale sur les capacités de pénétration et d'inhibition de la fonction Rev puis de la réplication virale.

(1)



(2)

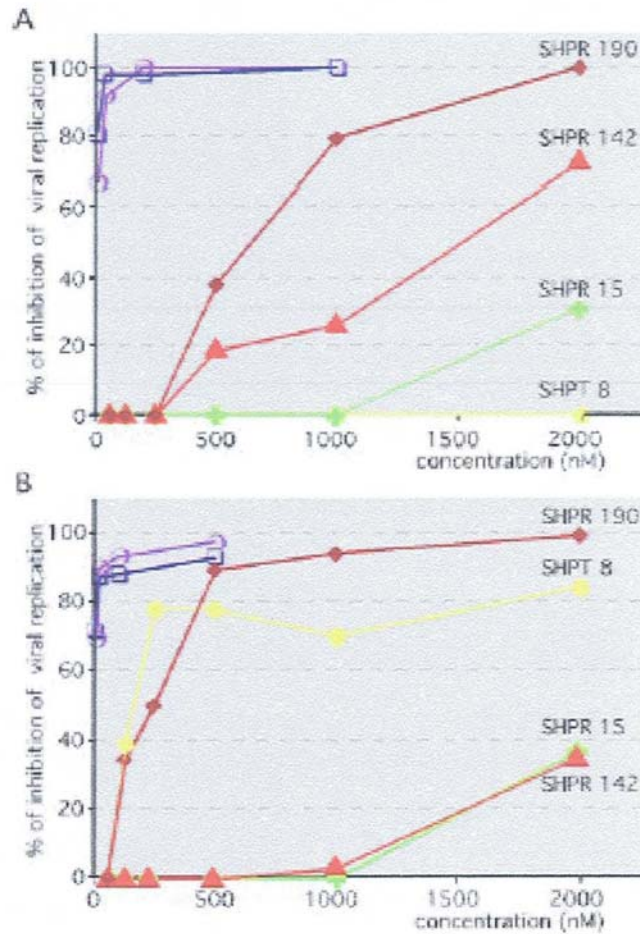


Figure 36 : Inhibition de la réplication virale par des peptides dirigés contre la fonction Rev

(1) Séquence des SHP (*Sumo Heptapeptide Protein transduction domain*). L'heptapeptide dirigé contre Tat, Rev ou le NES de Rev est fusionné au domaine basique de Tat (PTD) et à la protéine SUMO mutée au niveau de son motif diglycine. En aval de cette dernière, une partie du domaine GAD issu du criblage en double hybride est conservée. L'épitope Flag a été ajouté à l'extrémité N-terminale, pour permettre la purification des protéines recombinantes.

(2) Inhibition de la réplication virale par les SHP dans des cellules sanguines mononucléées (A) et dans des macrophages (B). Les cellules ont été traitées avec un SHP dirigé contre Tat (SHPT) ou contre Rev (SHPR), ou avec un inhibiteur connu comme l'AZT (tracé bleu) ou l'Idinavir (tracé violet), puis infectées par la souche virale HIV-1LAI. La réplication virale a été mesurée au jour 7, par dosage de l'activité de la transcriptase inverse dans les surnageants de culture.

D'après Roisin et al., 2004.

IV.2. Régulation de la fonction Rev par l'ubiquitine et par SUMO

Comme décrit dans un précédent paragraphe, les fonctions de diverses protéines virales sont régulées par des modifications post-traductionnelles, classiquement désignées pour la modulation des fonctions cellulaires. Parmi elles, les modifications par l'ubiquitine ou par les protéines SUMO affectent particulièrement la stabilité et la localisation de nombreuses protéines, et servent d'étiquettes moléculaires pour leur mise en activité ou leur extinction.

Par ailleurs, l'ubiquitylation et la sumoylation conduisent fréquemment à la dégradation de la protéine cible. Il en est le cas pour des protéines incorrectes qui pourraient affecter lourdement les fonctions cellulaires, ou pour des protéines dont l'activité n'est nécessaire qu'à des moments bien précis dans les processus cellulaires.

Dans le cadre d'une infection virale, la plupart des virus ont adapté leurs fonctions en détournant les voies cellulaires et en exploitant les possibilités de modifications post-traductionnelles à leur profit. Pour le HIV-1, il a déjà été montré que certaines protéines virales utilisent les modifications par l'ubiquitine ou SUMO pour exercer leur fonction dans le cycle viral ou pour atténuer les réponses immunitaires. En particulier, la protéine Tat, l'élément régulateur clé de l'expression des gènes viraux, exploite l'ubiquitine pour permettre une réplication efficace. De la même manière, l'activité de la protéine Tax du virus HTLV-1 sur l'expression des gènes cellulaires et viraux est finement régulée par les systèmes ubiquitine et SUMO.

Qu'en est-il de Rev, l'autre protéine régulatrice fondamentale du HIV-1 ? Etant donné la complexité des mécanismes moléculaires intervenant dans sa fonction régulatrice, il est très probable qu'elle soit également modulée dans la cellule, pour répondre de manière adaptée aux exigences du virus et aux réponses cellulaires. Cependant, outre la mise en évidence de sites de phosphorylation qui par ailleurs ne régulent pas son activité, aucune modification post-traductionnelle qui pourrait moduler la fonction Rev n'a été identifiée.

Ainsi, pour l'ensemble de ces raisons, je me suis précisément intéressée au rôle de l'ubiquitine et de la protéine SUMO-1 sur la fonction Rev, afin d'établir un éventuel lien entre ces systèmes et l'activité de la protéine virale.

RESULTATS

I. Inhibition de la fonction Rev par les SHPR

Les résultats encourageants concernant le pouvoir inhibiteur des SHPR190 et SHPR142 sur la réplication virale nous ont conduits à poursuivre les investigations afin de comprendre comment ils agissent sur la fonction Rev. Par ailleurs, nous avons regardé si tout ou partie de leur séquence peut être éliminée ou remplacée, dans l'objectif ultime d'optimiser leurs propriétés et d'améliorer leur efficacité.

1.1. Mécanismes d'action des SHPR

Les étapes préliminaires d'identification de peptides interagissant avec Rev et capables d'inhiber la fonction de cette protéine et la réplication virale, n'ont pas apporté de données quant à leur mécanisme d'action contre Rev. Afin d'améliorer leur action antivirale, il devenait important de connaître comment les SHPR agissent sur Rev, c'est-à-dire à quelle étape du cycle de transport de Rev ils interviennent. Nous avons ainsi étudié l'effet des SHPR sur différents aspects de la fonction Rev : Sont-ils capables d'interférer avec la fixation de Rev sur sa séquence cible ARN? Peuvent-ils compromettre la liaison de l'un de ses partenaires cellulaires comme hCRM1? Provoquent-ils la séquestration de Rev dans un compartiment cellulaire, l'empêchant ainsi d'exercer correctement sa fonction ? Entraînent-ils une déstabilisation massive de la protéine virale? Chacune de ces questions a été étudiée, afin de déterminer les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la fonction Rev par les SHPR.

1.1.1. Les SHPR n'interfèrent pas avec l'interaction Rev/ RRE

Le rôle de Rev dans la réplication virale est de reconnaître spécifiquement les ARNm viraux contenant l'élément RRE, et de les diriger vers le cytoplasme afin qu'ils servent de matrice pour la synthèse des protéines virales ou d'ARN génomique qui sera encapsidé dans les nouveaux virions.

Il est possible que les SHPR bloquent la liaison de Rev sur ces ARNm par une interaction compétitive sur le RRE. Nous avons examiné cette probabilité par des expériences de retard de migration de sonde nucléotidique. Cette approche consiste à mélanger un substrat nucléotidique avec une protéine capable de reconnaître spécifiquement ce substrat, puis de regarder le profil de migration de l'oligonucléotide. La fixation d'un ou plusieurs monomères protéiques sur le substrat est révélée par l'apparition de bandes de plus haut poids moléculaire que le substrat non conjugué.

Nous avons ainsi créé une sonde ribonucléotidique correspondant à la séquence RRE du HIV-1 et radiomarquée au ^{32}P , et nous l'avons incubée avec une protéine Rev recombinante fusionnée à la protéine GST (*Glutathione-S-Transferase*), grâce à laquelle nous avons purifié la chimère Rev-GST.

De cette manière, nous observons une échelle de bandes correspondant à des complexes de plus haut poids moléculaire que la sonde non conjuguée, lorsque Rev-GST est présente (Figure 37(A) à droite, pistes 1 à 4). Ces bandes indiquent la formation de complexes d'une ou plusieurs molécules de Rev fixées sur le RRE. Pour confirmer la spécificité d'interaction entre Rev et la séquence RRE, nous avons d'une part incubé Rev-GST avec une sonde RRE antisens (Figure 37(A) à droite, piste 7), et d'autre part mélangé la sonde RRE sauvage avec la protéine GST (Figure 37(A) à droite, pistes 5 et 6). Dans aucun cas nous n'observons de produits correspondant à des complexes ribonucléoprotéiques : les bandes observées sont bien le résultat d'une interaction spécifique entre Rev et sa sonde ARN cible.

Nous avons également vérifié que les SHPR ne s'associent pas avec la sonde RRE de manière non spécifique, en incubant un large excès de SHPR142 ou SHPR190 avec la sonde RRE radiomarquée (Figure 37(A) à gauche). Alors que la formation de complexes est apparente lorsque la protéine Rev-GST est incubée avec la sonde, aucune bande de plus haut poids moléculaire n'est révélée avec les SHPR, confirmant l'absence d'interaction avec la sonde ARN (Figure 37 (A), à gauche, comparer piste 1 avec pistes 2 et 3).

Grâce à ce protocole de retard de migration spécifique, nous avons alors étudié l'effet de la présence de SHPR sur la formation des complexes Rev/RRE. Nous avons mélangé la protéine Rev-GST avec des quantités croissantes de l'un des SHPR 190 ou 142, puis nous avons ajouté la sonde RRE. Pour contrôler la spécificité d'interaction entre ces SHPR et la sonde RRE seule ou en complexe avec Rev-GST, nous avons remplacé le SHPR par une protéine

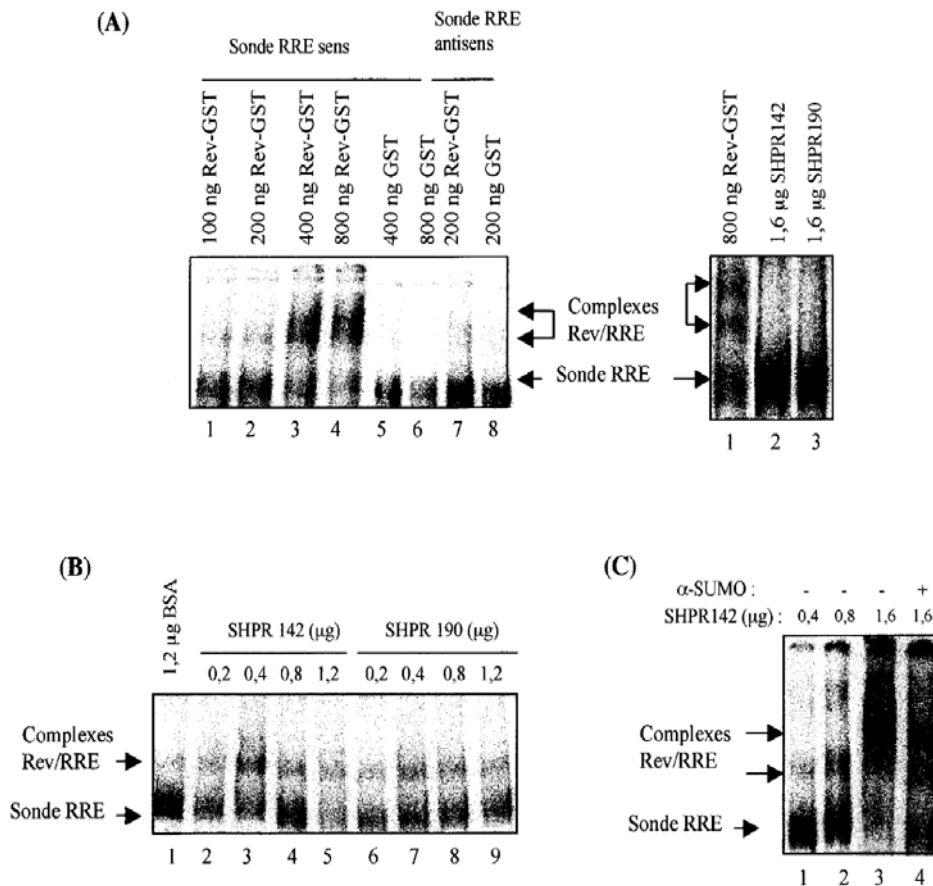


Figure 37 : Les SHPR n'interfèrent pas avec la liaison de Rev sur son élément de réponse RRE présent sur les messagers viraux.

La formation de complexes entre la protéine Rev et la sonde ARN correspondant au RRE est visualisée par un retard de migration de la sonde radiomarquée sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (EMSA).

- (A) Panneau de gauche : Des quantités croissantes de protéine recombinante Rev-GST ont été incubées en présence de sonde RRE radiomarquée (pistes 1 à 4), ou en présence d'une sonde correspondant à la séquence antisens du RRE (piste 7). La protéine GST a été choisie comme contrôle de la spécificité d'interaction entre Rev et la sonde (pistes 5, 6 et 8). Panneau de droite : L'absence d'interaction entre la sonde et les SHPR142 et 190 a été vérifiée en incubant 1,6 µg de SHP avec la sonde RRE radiomarquée (pistes 2 et 3)
- (B) 400 ng de protéine Rev-GST ont été préalablement incubés en présence de différentes concentrations de SHPR142 (pistes 2 à 5), de SHPR190 (pistes 6 à 9) ou d'un excès de BSA utilisée comme protéine contrôle (piste 1). Après incubation avec la sonde RRE radiomarquée, les mélanges ont été analysés sur gel.
- (C) L'expérience a été conduite de la même manière que précédemment avec le SHPR142, puis un excès d'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1 a été ajouté au mélange quelques minutes avant dépôt sur gel (piste 4).

quelconque, la BSA (*Bovine Serum Albumine*) (Figure 37 (B)). Comme attendu, le profil de migration reste inchangé lorsque la BSA est pré-incubée avec Rev-GST, puisque la bande correspondant aux complexes Rev/RRE est conservée (Figure 37(B), piste 1). De manière intéressante, le même profil est observé en présence d'un large excès de SHPR 190 ou 142 (Figure 37 (B), pistes 2 à 9). Ces observations indiquent que les SHPR ne se fixent pas sur la séquence RRE ni sur les complexes Rev/RRE.

Afin de confirmer l'absence d'interaction entre les SHPR et l'ARN, complexé ou non à Rev-GST, nous avons réalisé des expériences de super retard de migration, en incubant un anticorps dirigé contre la protéine SUMO-1, présente dans la séquence des SHPR. L'interaction de cet anticorps avec le SHPR retarde sa migration dans le gel, puisque le complexe formé est de plus haut poids moléculaire. Si le SHPR se fixe sur la sonde RRE, ce retard de migration est donc révélé par la radiographie, et on observe un signal positionné à proximité du point de départ de la migration, puisque les complexes sont retardés dans le gel. Nous observons qu'en présence de SHPR142 et de l'anticorps dirigé contre SUMO-1, le profil de migration des complexes Rev/RRE est inchangé (Figure 37(C), comparer pistes 3 et 4). Dans de telles conditions, aucun retard de migration supplémentaire du complexe Rev/RRE n'est observé, ce qui confirme que les SHPR ne se fixent pas sur ces complexes.

Ces observations indiquent que les SHPR ne se fixent pas sur la séquence ARN virale, à la place ou à proximité du site de liaison de Rev, et ne perturbent pas la formation de complexes oligomériques le long du RRE.

1.1.2. Les SHPR n'entrent pas en compétition avec hCRM1 pour la liaison sur Rev

L'activité de Rev dans l'export des ARNm viraux fait intervenir différents partenaires cellulaires, dont les fonctions sont alors détournées au profit de la réplication virale. Parmi eux, le facteur d'export hCRM1 joue un rôle fondamental puisqu'il reconnaît la séquence NES de Rev et permet de transporter les complexes ribonucléoprotéiques vers et à travers les pores nucléaires. Par ailleurs, les motifs heptapeptidiques formant les SHPR190 et 142 sont dirigés contre la séquence NES de Rev, celle-là même qui est impliquée dans l'interaction de Rev avec hCRM1. C'est pourquoi nous avons cherché à caractériser cette interaction protéique, afin de déterminer le rôle des SHPR dans l'association de Rev avec hCRM1.

Des travaux relativement simples peuvent être effectués afin d'établir une interaction directe entre deux protéines *in vitro* ou *in vivo*. En effet, en réalisant une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique, il est possible de purifier une protéine donnée présente dans un extrait cellulaire. L'analyse par immunoempreinte des fractions purifiées avec un anticorps dirigé contre un partenaire connu ou supposé de cette protéine permet de définir leur éventuelle interaction dans la cellule.

Selon ce principe, nous avons transfecté des cellules simiennes COS7 avec un vecteur permettant l'expression de la protéine CRM1 humaine (hCRM1), avec un plasmide codant pour la protéine Rev fusionnée au motif Flag, ou avec les deux. Nous avons ensuite immunoprécipité la protéine Flag-Rev grâce à un anticorps dirigé contre le motif Flag, et analysé les fractions purifiées par immunoempreinte avec un anticorps dirigé contre hCRM1, puis contre Flag (Figure 38). Bien que l'expression des deux protéines soit correcte dans tous les cas (Figure 38, pistes 1 à 3), la protéine hCRM1 n'est pas détectée de manière significative dans les fractions purifiées contenant FlagRev (Figure 38, en haut, pistes 4 à 6). Dans ces conditions, l'interaction entre la protéine virale Rev et son partenaire cellulaire hCRM1 n'a donc pas pu être observée de manière suffisamment claire pour pouvoir évaluer l'effet des SHPR. Il est probable que cette interaction soit trop éphémère ou trop fragile pour pouvoir l'observer dans un contexte cellulaire, ou qu'un autre co-facteur important soit limitant dans les cellules utilisées. En particulier, la protéine RanGTPase est essentielle aux mouvements nucléo-cytoplasmiques des cargos cellulaires. Un mutant de cette protéine, le mutant RanQ69L, est constitutivement lié au GTP, ce qui permet de renforcer les interactions protéiques dans le noyau. Ce mutant a été ajouté en large excès dans les conditions précédemment décrites, mais nous n'avons pu observer d'interaction entre Rev et hCRM1 (non illustré).

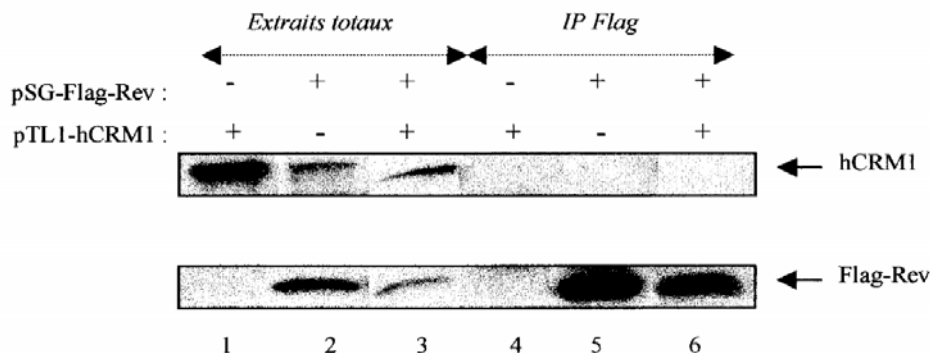


Figure 38 : Interaction entre Rev et hCRM1 *in vivo*.

Les cellules COS7 ont été transfectées avec 1 µg de vecteur exprimant la protéine CRM1 humaine (pistes 1 et 4) ou avec 4 µg de plasmide exprimant Rev étiquetée par l'épitope Flag (pistes 2 et 5), ou avec les deux (pistes 3 et 6). 42 heures après transfection, des quantités égales d'extraits cellulaires ont été immunoprécipitées par l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope Flag. L'analyse d'extraits totaux (pistes 1 à 3) ou d'extraits après IP (pistes 4 à 6) a été effectuée par immunoempreintes à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre hCRM1 (panneau du haut) ou de l'anticorps monoclonal dirigé contre Flag (panneau du bas).

Une autre approche permettant de visualiser des interactions protéiques consiste à effectuer des mélanges de protéines recombinantes *in vitro*. La purification de l'une ou l'autre des protéines conduira à purifier le partenaire, qui peut être détecté par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps spécifique. Nous avons utilisé cette approche afin d'enrichir les extraits cellulaires en complexes Rev/hCRM1, et de pouvoir détecter une interaction entre les deux protéines. Nous avons ainsi mélangé des extraits de cellules épithéliales humaines (HeLa) surexprimant les deux protéines avec de la protéine recombinante RanQ69L étiquetée du motif Flag et retenue sur une résine spécifique. Les cellules expriment également une construction correspondant au RRE, afin de renforcer la stabilité des complexes formés avec Rev. Les fractions éluées par compétition avec un peptide formé de la séquence Flag contiennent la protéine FlagRanQ69L et les protéines qui lui sont associées. Ainsi, les immunoempreintes réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre Rev (Figure 39, panneau du bas) et contre hCRM1 (Figure 39, panneau du haut) indiquent la présence de chacun des

partenaires dans les fractions éluées de la résine : l'interaction entre Rev et hCRM1 est évidente (Figure 39, piste 4).

Nous avons alors étudié l'effet de la présence du SHPR190 sur cette interaction. Nous avons transfecté les mêmes cellules HeLa avec un plasmide supplémentaire codant pour le SHPR190 ou pour un SHP contrôle, le SHPT8. Ce SHPT8 est un SHP dirigé contre la protéine virale Tat (Roisin et al., 2004). Il n'est donc pas actif contre Rev, et tient lieu de témoin négatif. Comme attendu, les bandes correspondant à Rev et à hCRM1 sont révélées en présence de SHPT8, qui n'intervient aucunement dans l'interaction entre les deux protéines (Figure 39, comparer pistes 4 et 6). De la même manière, la présence du SHPR190 n'affecte pas la formation de complexes Rev/hCRM1, puisque chaque protéine est présente dans la fraction purifiée avec FlagRanQ69L (Figure 39, comparer pistes 4 et 5). Le SHPR190 n'entre donc pas en compétition avec hCRM1 pour l'association à Rev.

De manière intéressante, nous observons que dans ces conditions de surexpression du SHPR190, la quantité de Rev présente dans les extraits cellulaires est réduite, en comparaison avec celle détectée en absence de SHP ou en présence du SHPT8 (Figure 39, comparer pistes 1 et 2). Ces variations ne sont pas dues à des différences de quantités déposées pour l'immunoempreinte, puisque l'immunoempreinte utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'actine, une protéine très abondante dans les cellules, montre l'homogénéité des dépôts (Figure 39, panneau du bas, pistes 1 à 3). Ces observations suggèrent qu'en présence du SHPR190, une partie des protéines Rev est dégradée ou redistribuée dans un compartiment cellulaire insoluble, et n'aurait donc pas pu être extraite dans le tampon utilisé lors de la lyse cellulaire.

Nous avons entrepris de vérifier chacune de ces deux hypothèses, afin de déterminer si l'une ou l'autre correspond en effet au mode d'action des SHPR sur Rev.

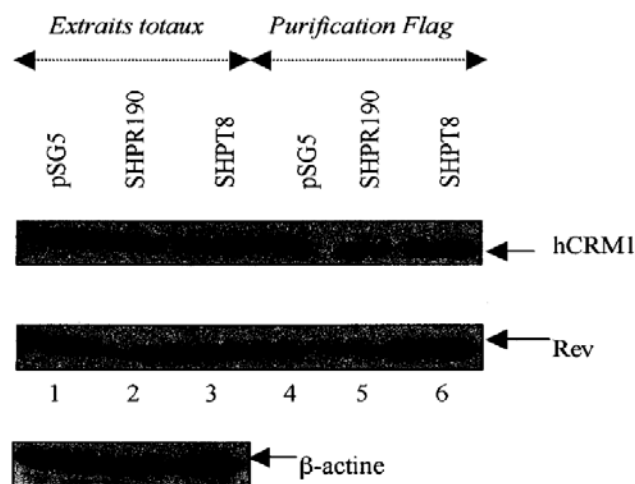


Figure 39 : Le SHPR190 n'empêche pas l'interaction entre Rev et hCRM1 *in vitro*.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 2 µg de plasmide exprimant la protéine Rev, 2 µg de plasmide exprimant hCRM1, 0,5 µg de vecteur exprimant une construction ARN correspondant au RRE et 4 µg de vecteur contrôle pSG5 (pistes 1 et 4) ou des plasmides exprimant le SHPR190 (pistes 2 et 5) ou le SHPT8 (pistes 3 et 6).

42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été incubés avec une résine sur laquelle a préalablement été fixée la protéine recombinante FlagRanQ69L, pendant 3 heures à 4°C et en présence de 100mM GTP. Après lavages de la colonne, les protéines associées à FlagRanQ69L ont été éluées par compétition avec le peptide Flag. Des quantités égales d'extraits cellulaires avant purification sur la résine (pistes 1 à 3) ainsi que les fractions éluées de la colonne (pistes 4 à 6) ont été analysées par immunoempreintes à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre hCRM1 (panneau du haut) ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneau du milieu). L'homogénéité des dépôts des extraits cellulaires totaux a été évaluée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la β-actine (panneau du bas).

1.1.3. Les SHPR n'affectent pas la localisation de Rev dans la cellule

Une des hypothèses principalement intéressante est d'imaginer que les SHPR entraînent une redistribution de Rev dans la cellule, l'écartant ainsi de ses séquences ARN cibles ou de l'un de ses partenaires. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules HeLa surexprimant Flag-Rev et le SHPR190 (Figure 40).

Dans les cellules surexprimant Flag-Rev uniquement, la protéine est présente de manière diffuse dans les différents compartiments cellulaires (Figure 40 (A)). Ces observations s'accordent avec certaines données de la littérature, qui indiquent que la protéine Rev

surexprimée dans les cellules est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Kalland et al., 1994 ; Venkatesh et al., 2003). Ces résultats sont par ailleurs en accord avec la propriété de Rev à effectuer la navette entre noyau et cytoplasme.

Cependant, plusieurs auteurs ont montré que Rev est principalement localisée dans le noyau des cellules à l'état d'équilibre (Hakata et al., 2002). D'autres ont également indiqué qu'une fusion Rev-GFP est majoritairement accumulée dans les nucléoles (Stauber et al., 1995).

Il est possible que le large excès de protéines Rev présentes dans la cellule, ou que l'utilisation du motif Flag en fusion avec la protéine virale modifie sa distribution intracellulaire. Par ailleurs, la fixation des cellules peut endommager les épitopes Rev, et le marquage immunologique avec l'anticorps dirigé contre Flag produit un léger bruit de fond, qui peut parfois être difficile à distinguer du signal spécifique de la protéine virale.

Lorsque les cellules sont traitées avec la Leptomycine B (LMB), un inhibiteur spécifique de hCRM1 et des processus d'export qui en dépendent, Rev est retenue dans le noyau et les nucléoles, et est complètement exclue du compartiment cytoplasmique (Figure 40 (B)). Ces observations sont en accord avec les différentes études utilisant cet antibiotique, qui montrent la séquestration de Rev dans le compartiment nucléaire lorsque l'export médié par hCRM1 est bloqué par la LMB. Les conditions d'immunofluorescence utilisées sont donc correctes et peuvent permettre d'étudier l'impact d'inhibiteurs sur la localisation intracellulaire de Rev. Ainsi nous observons que, en présence de SHPR190, la répartition intracellulaire de Rev n'est pas affectée, et la protéine est présente de façon diffuse dans chacun des compartiments de la cellule (Figure 40 (C)).

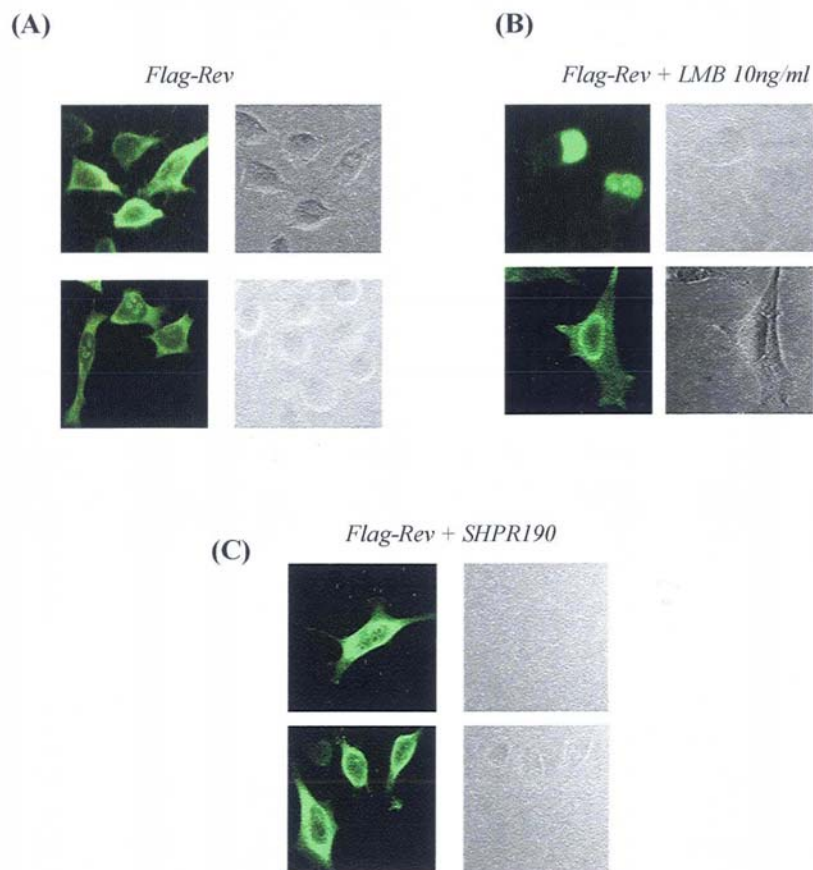


Figure 40 : La répartition de Rev dans les cellules n'est pas affectée par la présence du SHPR190.

Les cellules HeLa ont été transfectées par 4 μ g de plasmide permettant l'expression de Rev étiquetée avec l'épitope Flag, seul (images (A)), ou en présence de 4 μ g de plasmide permettant l'expression du SHPR190 (images (C)). Certaines cellules exprimant uniquement Flag-Rev ont été traitées pendant 4 heures avec 10ng/ml de Leptomycine B (images (B)). L'ensemble des cellules a été récupéré 24 heures après transfection, puis une immunofluorescence a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope Flag (en vert). Les cellules ont également été observées en transmission (en gris). Les images représentent un plan médian des cellules enregistré en microscopie confocale.

Pour confirmer ces observations, nous avons réalisé un fractionnement cellulaire à partir de cellules HeLa co-transfectées par Rev en présence ou non d'un SHP, et en présence d'une construction correspondant au RRE (Figure 41). Ce protocole utilise différents détergents et des concentrations salines particulières pour séparer la phase cytoplasmique, la phase nucléaire et les membranes cellulaires. L'analyse par immunoempreinte d'un aliquot de chacune des fractions permet de définir la répartition intracellulaire d'une protéine donnée, en l'occurrence ici Rev. Ainsi, l'immunoempreinte réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre Rev montre que la protéine est distribuée à la fois dans les fractions nucléaire, cytoplasmique

et membranaire, et ce indépendamment de la présence du SHPR190 ou du SHPT8 (Figure 41, panneau du haut).

L'immunoempreinte réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la Ribonucléotide Réductase (*Ribonucleotide Reductase polypeptide M2, RRM2*), une protéine cytoplasmique, permet de contrôler la qualité du fractionnement (Figure 41, panneau du bas). Nous pouvons constater une légère fuite du signal correspondant à cette protéine dans les fractions nucléaires. Une partie des cellules n'a donc probablement pas été cassée correctement lors de la séparation des noyaux. Toutefois, cette fuite reste globalement faible, et les signaux intenses révélés par l'anticorps dirigé contre l'épitope Flag correspondent très majoritairement à de la protéine Rev présente dans le noyau.

D'une manière surprenante, nous constatons là encore que la quantité de protéines Rev présente dans chacun des compartiments cellulaires diminue lorsque le SHPR190 est présent (Figure 41, comparer pistes 1 et 2). Ces observations supportent de nouveau l'hypothèse d'une déstabilisation de Rev par le SHPR190.

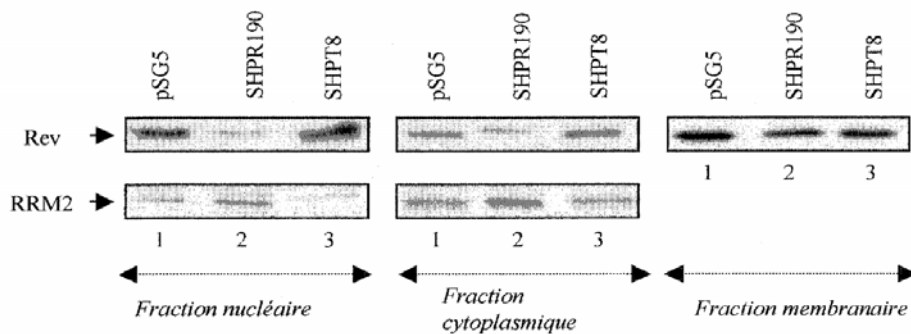


Figure 41 : Le SHPR190 ne modifie pas la répartition intracellulaire de Rev.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 2 µg de plasmide exprimant la protéine Rev, 0,5 µg de plasmide exprimant une construction correspondant au RRE, et 6 µg de vecteur contrôle pSG5 (piste 1) ou d'un plasmide exprimant le SHPR190 (piste 2) ou le SHPT8 (piste 3). 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été séparés en fractions nucléaire (à gauche), cytoplasmique (au centre) et membranaire (à droite). L'immunoempreinte a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneaux du haut). La qualité du fractionnement cellulaire a été évaluée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine cytoplasmique ribonucléotide réductase RRM2 (panneaux du bas).

1.1.4. Les SHPR déstabilisent la protéine Rev dans les cellules

Ayant exclu l'hypothèse d'une relocalisation de Rev dans la cellule en présence du SHPR190, nous avons approfondi les expériences afin de déterminer son rôle sur la stabilité de la protéine virale.

Nous avons réalisé des extraits de cellules COS7 transfectées avec des plasmides permettant l'expression de la protéine Flag-Rev et d'un SHPR, dans un tampon riche en détergents et en inhibiteurs de protéases afin d'éliminer au maximum l'activité de protéolyse.

Les deux SHPR efficaces contre la fonction Rev ont été testés, les SHPR190 et 142, ainsi qu'un SHP dirigé contre Rev mais incapable d'inhiber sa fonction, le SHPR15 (Figure 42).

L'immunoempreinte réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre le motif Flag montre une diminution drastique de la quantité de Rev lorsque le SHPR190 est présent (Figure 42(A), panneau du haut, comparer pistes 1 et 4). Cette diminution est de l'ordre des 80% en moyenne, et peut atteindre les 95% (Figure 42 (B), panneau de gauche, piste 4). Cet effet est visible mais moins marqué en présence du SHPR142, et le signal Rev est réduit de 30 à 70% selon l'expérience (comparer pistes 1 et 3, Figure 42 (A) en haut et Figure 42 (B) à gauche). A l'inverse, et comme attendu, la présence du SHPR15 n'affecte nullement l'abondance intracellulaire de Rev, puisque l'intensité du signal révélé par l'immunoempreinte est similaire à celle observée en l'absence de SHPR (comparer pistes 1 et 2 sur Figure 42 (A) en haut et Figure 42 (B) à gauche). Ces observations indiquent que la stabilité de Rev dans les cellules est affectée par la présence des SHPR inhibiteurs.

L'immunoempreinte utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1, indique que la concentration intracellulaire en SHPR15, SHPR142 et SHPR190 est identique (Figure 42(A), panneau du milieu). De plus, l'immunoempreinte réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'actine montre l'homogénéité des différents dépôts (Figure 42(A), panneau du milieu). La forte variation du niveau de Rev est donc bien due à l'action du SHPR190, et non pas à une concentration plus forte en SHPR190 dans la cellule ou à une quantité différente d'extraits déposée pour l'analyse.

Selon la même approche, nous avons regardé l'effet des trois SHPR sur la concentration intracellulaire d'une autre protéine virale, la protéine Tat (Figure 42(A), panneau du bas).

Comme attendu, l'abondance de Tat dans les cellules ne varie pas lorsque l'un des SHPR est présent. Ces derniers agissent donc bien de manière spécifique contre la protéine virale Rev.

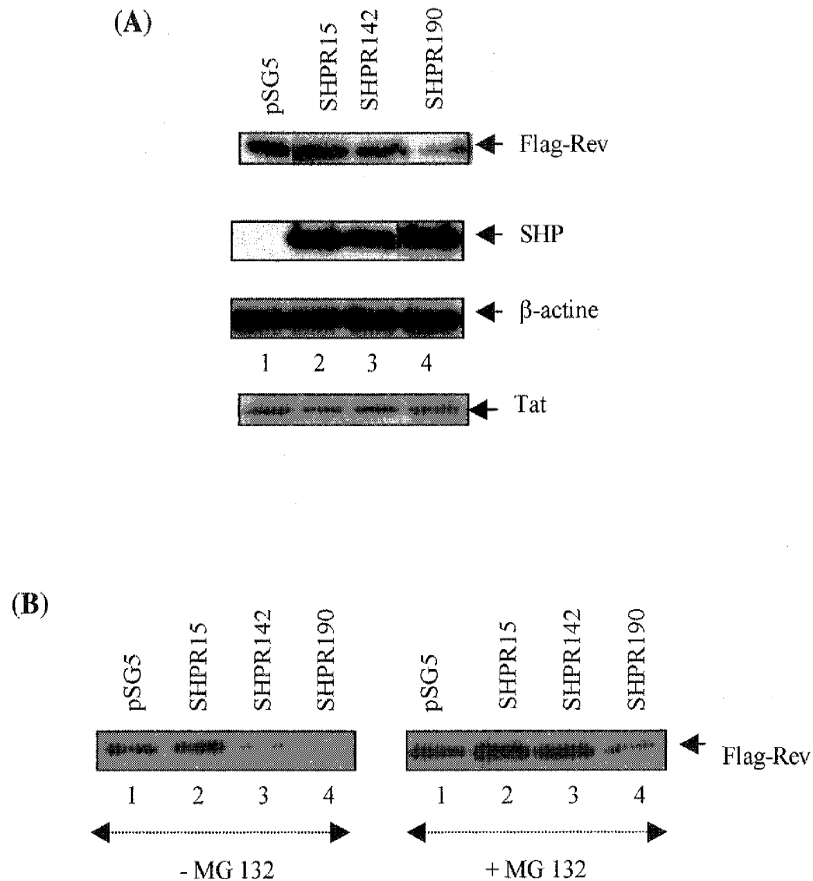


Figure 42 : Les SHPR 190 et 142 affectent la stabilité de Rev dans la cellule.

Les cellules COS7 ont été co-transfectées avec 4 μ g de plasmide exprimant la protéine Rev étiquetée de l'épitope Flag et avec 4 μ g de plasmide contrôle pSG5 (piste 1) ou exprimant le SHPR15 (piste 2), le SHPR142 (piste 3) ou le SHPR190 (piste 4). En Figure (A), les mêmes points de transfection ont également été réalisés avec un vecteur exprimant la protéine Tat au lieu de Rev.

- (A) 24 heures après transfection, des quantités égales d'extraits ont été analysées par immunoempreintes à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope Flag (panneau du haut), contre SUMO (panneau du milieu), ou contre la β -actine (panneau du milieu), ou à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine Tat (panneau du bas).
- (B) 19 heures après transfection, une partie des cellules (panneau de droite) a été traitée avec 20 μ M de MG132 pendant 5 heures, puis des quantités égales d'extraits ont été analysées par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre Flag. Les immunoempreintes utilisant les anticorps dirigés contre SUMO-1 et contre la β -actine ne sont pas illustrées.

Afin de déterminer le phénomène responsable de cette déstabilisation de Rev, nous avons étudié l'impact d'un inhibiteur spécifique du protéasome, le MG132, sur l'abondance intracellulaire de Rev en présence des SHPR (Figure 42(B)). En présence de cet inhibiteur, les protéines destinées à être dégradées par le protéasome sont plus abondantes dans la cellule, puisque leur destruction est interrompue.

Ainsi, l'immunoempreinte réalisée avec l'anticorps dirigé contre le motif Flag montre qu'après traitement au MG132, le niveau global de Rev détecté en présence du SHPR190 est partiellement restauré, et estimé à environ 28 % de le cas présent (Figure 42(B), comparer pistes 1 et 4, panneau de droite). Cette restauration atteint les 100% lorsque le SHPR142 est utilisé comme inhibiteur de Rev (Figure 42(B), comparer pistes 1 et 3, panneau de droite).

Ces observations indiquent que Rev est envoyée au protéasome par les SHPR pour y être dégradée. Dans le cas du SHPR190, la participation du protéasome reste partielle dans la dégradation de Rev, puisque le niveau intracellulaire de Rev n'est pas complètement rétabli lorsque le protéasome est inactif. Il est possible qu'un autre système de dégradation intervienne, ou qu'une partie de Rev soit relocalisée dans un compartiment difficile à extraire dans le tampon utilisé dans ces expériences.

Nous avons regardé si l'effet du MG132 se répercute d'une manière générale sur l'abondance de Rev dans les cellules par des expériences de fractionnement cellulaire. Nous avons transfecté des cellules HeLa avec les plasmides d'expression de Flag-Rev, de hCRM1, de l'un des SHPR190 ou SHPT8, et d'une construction correspondant au RRE. Ces conditions de transfection permettent d'ajuster la quantité de chacun des partenaires formant les complexes Rev/hCRM1/RRE. En se plaçant en large excès de chacun d'entre eux, nous optimisons ainsi la formation de ces complexes dans les cellules transfectées, à l'image des événements rencontrés lors d'une infection. Nous avons ensuite séparé la fraction nucléaire de la phase cytoplasmique et des membranes selon le protocole de fractionnement utilisé précédemment. L'analyse par immunoempreinte avec l'anticorps dirigé contre Flag montre que Rev se retrouve dans tous les compartiments cellulaires, indépendamment de la présence d'un SHP (Figure 43, panneaux du haut). Cependant, l'abondance de Rev dans chacune des trois phases cellulaires est fortement diminuée lorsque le SHPR190 est présent, alors que celle-ci n'est pas affectée par le SHPT8 (Figure 43, panneau du haut, comparer pistes 1 et 2 et piste 3).

L'immunoempreinte réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la Ribonucléotide Réductase (*RRM2*) montre une légère fuite du signal dans les fractions nucléaires (Figure 43, panneaux du bas). Cependant, cette fuite est similaire dans tous les cas et reste relativement faible. Les signaux détectés dans la fraction nucléaire à l'aide de l'anticorps dirigé contre Flag correspondent donc majoritairement à de la protéine Rev nucléaire. Par ailleurs, l'apparente accumulation de Rev dans les membranes est biaisée par la présence probable de cellules entières, qui n'ont pas été correctement brisées lors de la séparation des noyaux. En effet, une petite partie des cellules peut rester intacte et se retrouve dans la fraction contenant les membranes. Le signal observé correspond donc en partie aux protéines nucléaires et cytoplasmiques présentes dans les cellules entières.

L'ensemble de ces observations indique que le SHPR190 entraîne une dégradation massive de la protéine virale, qui conserve malgré tout sa répartition nucléo-cytoplasmique dans la cellule.

Nous avons alors étudié l'effet du MG132 sur l'abondance de Rev dans les différents compartiments (Figure 43, pistes 4 et 5). Comme attendu, le niveau global de Rev détecté dans chaque compartiment cellulaire en présence du SHPR190 est partiellement rétabli suite à un traitement au MG132 (Figure 43, comparer pistes 2 et 4). Ces observations confirment que le SHPR190 induit la dégradation rapide d'une partie des protéines Rev présentes dans la cellule, qui implique en partie la participation du protéasome.

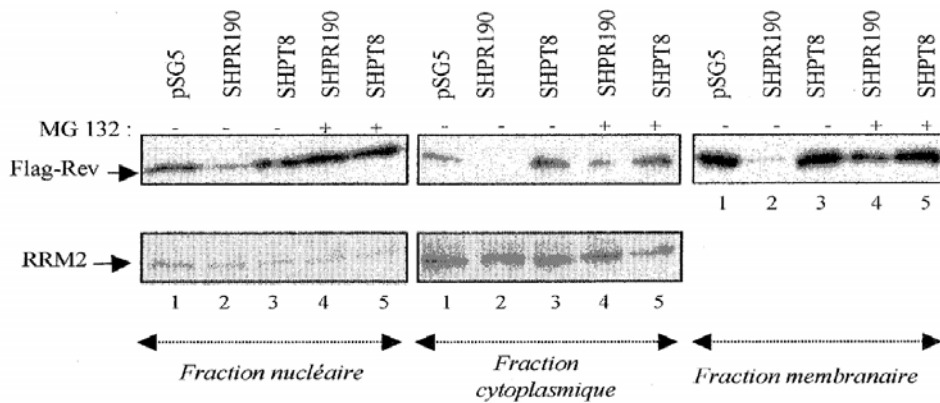


Figure 43 : Le SHPR190 affecte la stabilité intracellulaire de Rev, qui se retrouve en plus faible quantité dans chacun des compartiments de la cellule.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 1 µg de plasmide exprimant la protéine Flag-Rev, 1 µg de plasmide exprimant hCRM1, 0,5 µg de plasmide exprimant la construction RRE et 6 µg de plasmide contrôle pSG5 (piste 1) ou exprimant le SHPR190 (pistes 2 et 4) ou le SHPT8 (pistes 3 et 5). 42 heures après transfection, une partie des cellules a été traitée avec 20 µM de MG132 pendant 5 heures. Les extraits cellulaires ont été séparés afin de dissocier les fractions nucléaire (à gauche), cytoplasmique (au centre) et membranaire (à droite). Chaque fraction a été analysée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope Flag (panneau du haut). La qualité du fractionnement cellulaire a été vérifiée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la ribonucléotide réductase RRM2 (panneau du bas).

La plupart des substrats dégradés par le protéasome sont des formes modifiées par l'ubiquitine. En effet, les chaînes d'ubiquitine, reliées entre elles par les lysines 48 en particulier, forment un signal pour envoyer les protéines vers le protéasome. Nous avons voulu voir si Rev était polyubiquitylée en présence de SHPR inhibiteurs, par des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules exprimant la protéine Rev et le SHPR190, en présence ou non d'une forte concentration en ubiquitine. Cependant, nous n'avons pas observé de produits modifiés de Rev, même en ajoutant du MG132 pour maintenir intactes les formes polyubiquitylées (non illustré). Ces expériences d'immunoprécipitation sont certainement trop peu sensibles pour permettre de détecter les formes ubiquitylées de Rev.

1.1.5. Les SHP s'accumulent dans les noyaux des cellules transfectées

Afin d'établir le site d'action des SHPR sur la protéine Rev dans la cellule, nous avons réalisé des immunoempreintes à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1 à partir des différentes fractions cellulaires obtenues ultérieurement (cf. Figure 43).

Nous avons ainsi observé que les SHP sont présent dans le noyau et exclus du cytoplasme, aussi bien en l'absence de protéine hCRM1 exogène (non illustré) qu'en sa présence (Figure 44). Le signal observé dans les fractions membranaires provient probablement en partie de cellules entières recueillies après la séparation des noyaux.

Ces observations indiquent que dans des cellules transfectées, les SHP s'accumulent dans le noyau, probablement via le domaine basique de Tat (PTD). Le compartiment nucléaire est donc le lieu d'action principal des SHPR sur Rev.

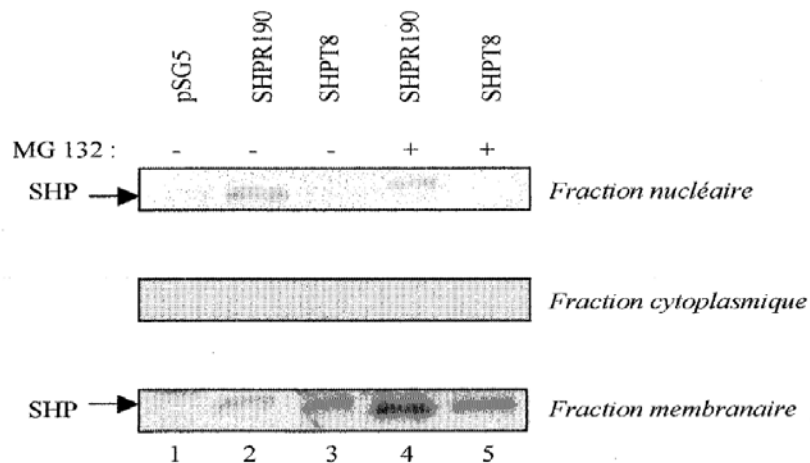


Figure 44 : Les SHP exprimés dans les cellules s'accumulent dans le noyau.

Les extraits de l'expérience décrite en figure 43 ont été utilisés pour réaliser une immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1. Pour rappel : Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 1 µg de plasmide exprimant la protéine Flag-Rev, 1 µg de plasmide exprimant hCRM1, 0,5 µg de plasmide exprimant la construction RRE et 6 µg de plasmide contrôle pSG5 (piste 1) ou exprimant le SHPR190 (pistes 2 et 4) ou le SHPT8 (pistes 3 et 5). 42 heures après transfection, une partie des cellules a été traitées avec 20 µM de MG132 pendant 5 heures (pistes 4 et 5). Les extraits cellulaires ont été séparés afin de dissocier les fractions nucléaire (à gauche), cytoplasmique (au centre) et membranaire (à droite), qui ont été analysées par immunoempreinte.

1.2. Optimisation des propriétés des SHPR

Un second axe de recherche a été d'étudier les multiples possibilités de mutations de la séquence du SHPR190, afin de caractériser les attributs qui lui sont essentiels pour son action contre Rev. De cette manière, il deviendra possible d'envisager la création d'un variant du SHPR190 dont les propriétés inhibitrices seront optimales. Ces travaux ont abouti à l'identification des séquences qui ne peuvent pas être éliminées ou modifiées sans perturber l'action du SHPR190, alors que d'autres ne sont pas essentielles au pouvoir inhibiteur du peptide.

Nous avons créé un panel de mutants du SHPR190 sauvage, dont la séquence est inscrite en Figure 45, par mutagenèse dirigée ou en réalisant des délétions de plusieurs acides aminés. Ces variants (décrits dans la Figure 47) ont ensuite été testés pour leur activité contre la fonction Rev. Les mutants présentant un avantage par rapport au SHPR190 sauvage ont été produits en bactéries sous forme de protéines recombinantes puis purifiés, afin d'être testés pour leur action sur la réplication virale dans des cultures cellulaires infectées. Cette dernière partie des travaux a été effectuée par l'équipe de Pascal Clayette, au laboratoire du CEA de Fontenay-aux-Roses.

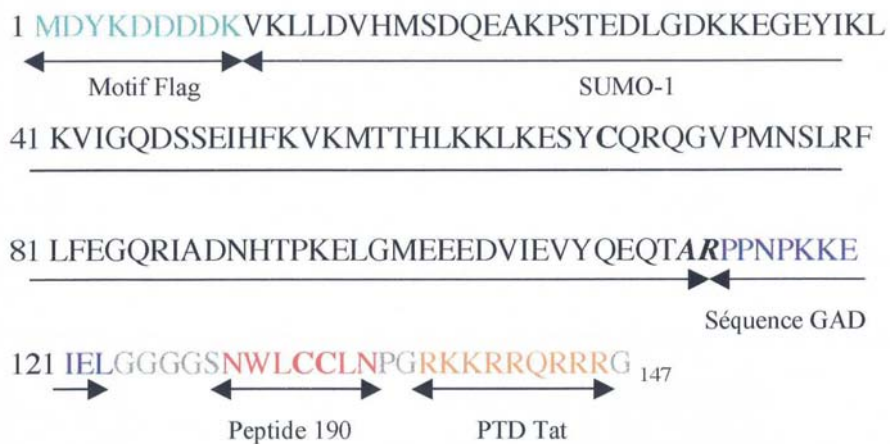


Figure 45 : Séquence peptidique du SHPR190 sauvage.

L'ensemble de la séquence inscrite ci-dessus indique les différentes régions constituant la molécule SHPR190 :

L'épitope Flag a été placé à l'extrémité amino-terminale du SHPR, afin de servir aux étapes de purification de la protéine recombinante. La protéine SUMO-1 possède une mutation au niveau des deux glycines carboxy-terminales en Alanine-Arginine (AR, en gras dans la séquence), afin d'éviter la probable coupure par des hydrolases cellulaires. 10 résidus de la séquence GAD, provenant de l'étape de criblage par double hybride chez la Levure, ont été conservés entre la protéine SUMO-1 et la séquence heptapeptidique 190. Cette dernière représente la séquence inhibitrice proprement dite, qui a été identifiée lors du criblage chez la Levure. Le domaine de pénétration intracellulaire (*Protein Transduction Domain, PTD*) de la protéine Tat du HIV-1 a été ajouté à l'extrémité carboxy-terminale du SHPR, afin de permettre sa rentrée dans les cellules. Plusieurs résidus Glycine ont été ajoutés de part et d'autres du peptide 190 et du PTD, afin de rendre plus flexible la molécule finale. La séquence possède 3 Cystéines, dont deux dans l'heptapeptide (C132 et C133) et une dans SUMO-1 (C68) (en gras).

L'efficacité d'inhibition de la fonction Rev des différentes molécules a été évaluée grâce à deux tests d'activité de la protéine virale (Figure 46). Le premier utilise un plasmide rapporteur désormais largement employé pour étudier l'activité d'export des ARN dépendants de Rev. Ce plasmide, appelé pDM128, contient la séquence codant pour l'enzyme CAT (*Chloramphenicol acetyl transferase*) fusionnée à l'élément de réponse à Rev, le RRE, et située dans un intron bordé des sites d'épissage 5' et 3' du gène *env* du HIV-1 (Figure 46 (A)). En l'absence de Rev fonctionnelle, l'ARNm est épissé et il n'y a pas expression de l'enzyme CAT. L'activité de Rev se traduit à l'inverse par la production de l'enzyme, qui peut se mesurer d'une manière simple par un dosage immunologique spécifique (ELISA).

Un autre vecteur a été créé pour étudier l'activité de Rev dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans des cellules infectées (Figure 46(B)). Celui-ci possède la séquence codant la protéine fluorescente d2eGFP située en position intronique et entourée de part et d'autre des fragments 5' et 3' du gène codant pour la protéine Rev. Les sites d'épissage 5' et 3' uniques permettent l'épissage conditionnel du fragment d2eGFP, et son expression dépend de l'activité de Rev.

Cette cassette a été insérée dans un vecteur permettant son maintien sous forme épisomique, afin d'éviter le problème récurrent d'extinction de gène (*gene silencing*), fréquemment rencontré lorsqu'une séquence est insérée aléatoirement dans le génome d'un organisme hôte. La construction finale, appelée pCEP4-d2eGFP-Rev, permet de créer un équilibre entre protéines Rev et GFP et rappelle les événements de la phase précoce du cycle viral, où l'absence de protéine Rev provoque sa propre expression.

Nous avons choisi une forme instable de la protéine fluorescente eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), la d2eGFP, puisque sa demi-vie est écourtée de moitié par rapport à la protéine eGFP classique. Ainsi, les protéines fluorescentes présentes dans le cytoplasme des cellules sont rapidement dégradées, et seule la protéine exprimée sous la dépendance de Rev est prise en compte.

Des extraits de cellules transfectées par ce plasmide rapporteur et les différents variants du SHPR190 peuvent être analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP. Les variations d'expression de la protéine d2eGFP traduisent alors le niveau d'activité de Rev dans les cellules. Alternativement, il est possible d'analyser les cellules correctement lavées - afin d'éliminer toute détection artéfactuelle de la GFP - par cytométrie de flux.

Nous avons également créé une lignée de cellules simiennes COS7 exprimant de manière stable la construction pCEP4-d2eGFP-Rev, afin d'obtenir un contexte cellulaire se rapprochant des conditions rencontrées lors d'une infection par le HIV-1. Ces cellules ont été utilisées dans des tests de transfection avec les plasmides exprimant les SHP, ou incubées directement avec des protéines SHP purifiées. De la même manière que précédemment, l'immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP ou une analyse en cytométrie de flux permet d'évaluer le niveau d'activité de Rev.

Il est à noter que le test ELISA, permettant le dosage de l'enzyme CAT, est très sensible et que les quantités de plasmide utilisées pour la transfection sont très faibles. Des variations expérimentales minimales peuvent alors occasionner une variabilité des résultats, parfois difficilement interprétables. Les données montrées dans le paragraphe suivant indiquent les résultats d'une seule expérience, représentative de l'ensemble des données obtenues par plusieurs expériences identiques. Par ailleurs, nos conclusions tiennent compte des variations observées en fonction du test d'activité utilisé.

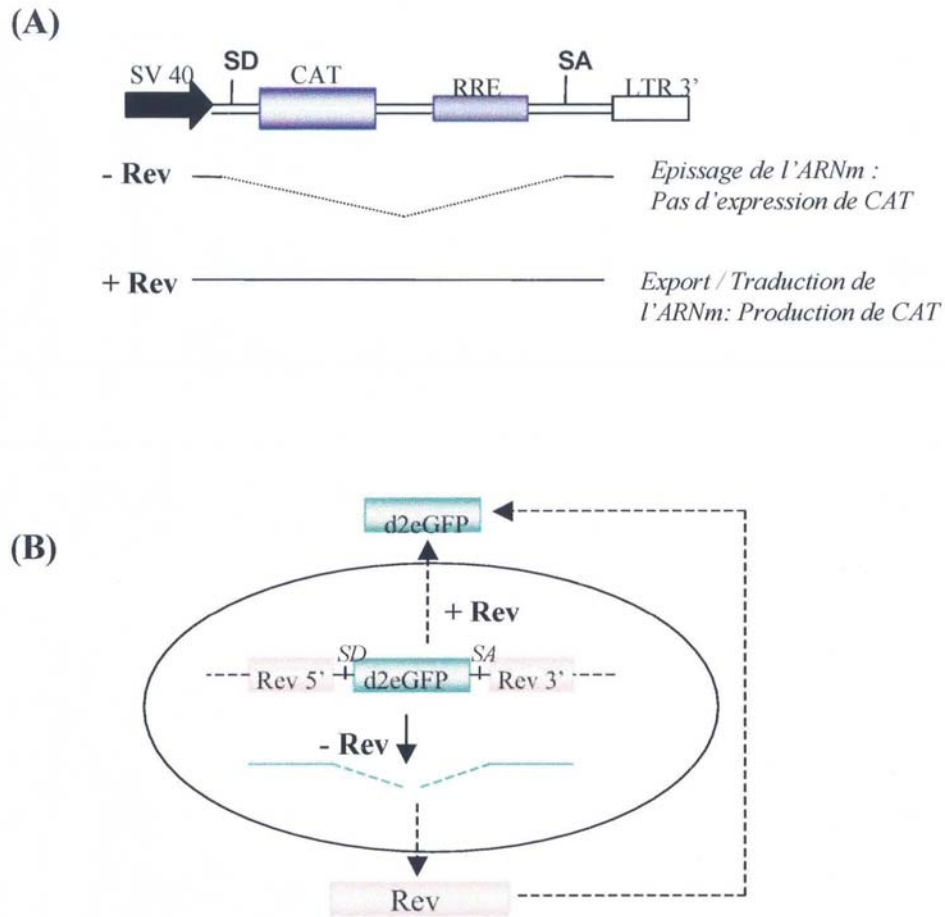


Figure 46 : Représentation schématique des plasmides rapporteurs utilisés pour mesurer l'activité de Rev dans les cellules.

- (A) Le vecteur *pDM128* contient la séquence codant pour l'enzyme CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*) et l'élément de réponse à Rev (RRE) en position intronique. Cet intron est bordé par un site d'épissage donneur unique (SD) et un site d'épissage accepteur unique (SA), utilisés en l'absence de Rev. Le promoteur utilisé est celui du virus simien SV40.
- (B) Le vecteur *pCEP4-d2eGFP-Rev* est constitué du gène codant pour la protéine d2eGFP, entouré de part et d'autre des séquences 5' et 3' du gène codant pour la protéine virale Rev. L'unique site donneur (SD) et l'unique site accepteur (SA) permettent l'épissage conditionnel du fragment codant pour d2eGFP, en fonction de l'activité Rev. Le même promoteur (SV 40) est utilisé dans ce vecteur.

I.2.1. Augmentation du pouvoir inhibiteur du SHPR190

Dénomination du mutant	Séquence du SHPR entre les positions 110 et 147
SHPR190 WT	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m1	TARPPNPKKEIELGGGGS N WLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m2	TARPPNPKKEIELGGGGSN A LCCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m3	TARPPNPKKEIELGGGGSNW A CCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m4	TARPPNPKKEIELGGGGSNWL A CLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m5	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCA L NPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m6	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCC A NPGRKKRRQRRRG
SHPR190 m7	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCCLA P GRKKRRQRRRG
SHPR190ΔG	TAR-GGGGSNWLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔGm1	TAR-GGGGS A WLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔGm4	TAR-GGGGSNWL A CLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔGm6	TAR-GGGGSNWLCC A NPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔG1	TARPPN-GGGGSNWLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔG2	TARPPNPKK-GGGGSNWLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔG3	TARPPNPKKEI-GGGGSNWLCCLNPGRKKRRQRRRG
SHPR190ΔPTD	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCCLNPG-
SHPR190ΔQ	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCCLNPGRKKRR-
SHPR190PolyR	TARPPNPKKEIELGGGGSNWLCCLNPGRRRRRRRRRG

Figure 47 : Liste des principaux mutants du SHPR190 étudiés.

Une portion de la séquence du SHPR190 sauvage et des différents variants étudiés est inscrite dans le tableau ci-dessus.

Des mutants simples ont été créés, par substitution d'une seule position parmi les sept de la séquence heptapeptidique 190 (en rouge) en un résidu Alanine (m1 à m7).

La séquence complète ou partielle du domaine GAD (en bleu) a été déléetée, seule ou en combinaison avec une mutation ponctuelle dans le peptide 190 (ΔG).

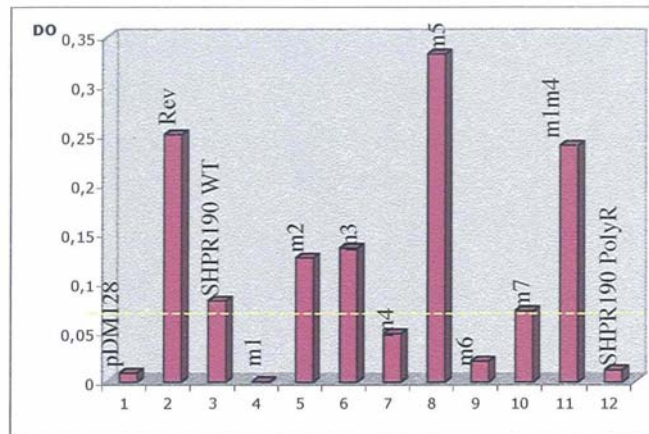
Le domaine de pénétration (en orange) a également été muté, par substitution avec une séquence de 9 résidus arginine (PolyR) ou par délétion totale ou partielle (ΔPTD, ΔQ).

a) Mutagénèse de l'heptapeptide et du PTD

Bien que l'heptapeptide 190 soit le motif inhibiteur le plus efficace parmi l'ensemble des peptides identifiés par le système du double hybride, nous avons regardé s'il est possible d'améliorer l'activité du SHPR190 en modifiant la séquence heptapeptidique.

Nous avons muté successivement chaque résidu de la séquence 190 en alanine (« *Alanine Scanning* »), et obtenu sept variants possédant une mutation ponctuelle (Figure 47). D'après les données obtenues par le test utilisant le vecteur pDM128, il est possible d'améliorer l'efficacité inhibitrice du SHPR190 en mutant les positions 1, 4 et 6 de l'heptapeptide (Figure 48 (A), comparer pistes 3 et 4, 7, 9).

(A)



Séquence peptide 190 WT : Asn-Trp-Leu-Cys-Cys-Leu-Asn

(B)

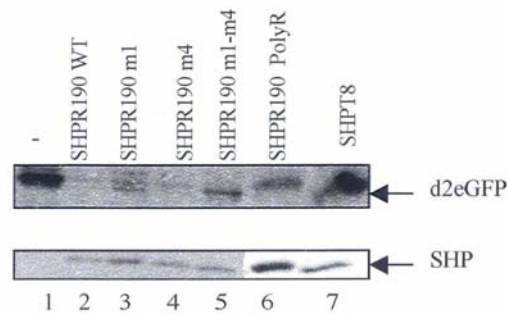


Figure 48 : Mutagenèse de l'heptapeptide inhibiteur N°190 et du domaine de pénétration.

- (A) Les cellules HeLa ont été transfectées avec 100 ng de plasmide rapporteur pDM128 seul (piste 1) ou en présence de 10 ng de plasmide exprimant la protéine Rev (pistes 2 à 11), 200 ng de plasmide exprimant le SHPR190 sauvage (piste 3) ou possédant une substitution en alanine d'un résidu de l'heptapeptide (m1 à m7, pistes 4 à 10) ou possédant un motif de 9 arginines à la place du PTD de Tat (piste 11) a également été ajouté lors de la transfection. 45 heures après transfection, les cellules ont été lysées dans un tampon spécifique permettant le dosage de la production d'enzyme CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*) par test ELISA. Le graphe indique la valeur d'absorbance (DO) correspondant à la coloration d'un substrat spécifique modifié par l'enzyme CAT. La séquence du peptide N°190 sauvage est indiquée en dessous des pistes 4 à 10, et les trois résidus dont la mutation en alanine est favorable à l'activité inhibitrice du SHPR190 sont soulignés.
- (B) Les cellules COS7 ont été co-transfectées avec 2 µg de plasmide rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev et 6 µg de plasmide contrôleur pSG5 (piste 1) ou de plasmide exprimant le SHPR190 sauvage (piste 2) ou muté (pistes 3 à 6), ou exprimant le SHPT8 (piste 7). 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine GFP (panneau du haut) ou dirigé contre la protéine SUMO-1 (panneau du bas).

Toutefois, d'après le système pCEP4-d2eGFP-Rev, aucune de ces mutations n'améliore l'efficacité du SHPR190 sauvage puisque, à même niveau d'expression, ce dernier réduit l'expression de la GFP le plus fortement (Figure 48 (B)). Nous observons ainsi que seule la mutation en position 4 permet de maintenir une inhibition efficace de la fonction Rev, mais

uniquement lorsque des quantités élevées de plasmide exprimant le SHPR sont utilisées lors de la transfection (6 µg) (Figure 48(B), comparer pistes 2 et 4). Par ailleurs, nous observons que la double mutation des résidus 1 et 4 abolit l'effet positif obtenu avec les substitutions simples.

La mutation de la cystéine en position 4 dans l'heptapeptide (en position 132 dans la séquence du SHPR190) présente un intérêt pour la stabilité et l'activité globale du SHPR190, puisque cette cystéine est susceptible de former un pont disulfure avec la cystéine voisine (position 5 de l'heptapeptide et C133 dans la séquence SHPR190). Dans des conditions non suffisamment réductrices, l'apparition de cette forme oxydée du SHPR190 pourrait compromettre son activité antivirale.

Nous avons également imaginé un variant du SHPR190 qui pourrait à la fois inhiber activement la fonction Rev et pénétrer efficacement dans les cellules. Dans cet objectif, nous avons testé l'efficacité d'inhibition d'un variant du SHPR190 contenant une séquence de 9 résidus arginine à la place du domaine de pénétration de Tat. Une telle séquence polyarginine a été montrée à plusieurs reprises comme capable de rentrer dans les cellules d'une manière plus efficace que le domaine basique de Tat (Ho et al., 2001 ; Jin et al., 2001). Si celle-ci s'avère favorable dans l'action contre Rev dans des tests de transfection cellulaire, il serait intéressant de produire la molécule SHPR190 contenant cette séquence polyarginine (PolyR) afin d'étudier ses propriétés de pénétration et d'inhibition de la réplication virale.

Avec le test utilisant le vecteur pDM128, nous observons que la substitution du PTD par une séquence polyarginine favorise largement le pouvoir inhibiteur du SHPR190, puisque le mutant est capable de réduire efficacement la production d'enzyme CAT (Figure 48(A), comparer points 3 et 12). Cependant les résultats obtenus avec le vecteur pCEP4-d2eGFP-Rev montrent une réduction de l'expression de la GFP moins importante que par le SHPR190 sauvage (Figure 48(B), comparer pistes 2 et 6). Il est donc probable que cette substitution affecte légèrement l'activité inhibitrice, mais des tests sur la réplication virale avec la protéine recombinante devront le prouver.

b) Délétions partielles de la séquence du SHPR190

Une des caractéristiques importantes pour l'efficacité et l'immunogénicité d'une molécule thérapeutique est portée sur l'absence de toute séquence superflue, c'est-à-dire non essentielle à son activité. C'est pourquoi nous avons cherché à réduire au maximum la séquence du SHPR190, en regardant si certaines régions peuvent être délétées sans affecter son pouvoir inhibiteur.

b.1) Le motif Flag peut être éliminé sans affecter l'efficacité du SHPR190

L'épitope Flag avait été ajouté à l'extrémité amino-terminale de la séquence du SHPR190 dans l'unique perspective de purifier rapidement les protéines recombinantes. En effet, ce motif permet la rétention de la protéine sur une résine spécifique, de laquelle elle est éluée par compétition avec un peptide correspondant à la séquence Flag. Alternativement, une protéase spécifique peut cliver le motif Flag présent sur la protéine, qui est libérée de la résine alors que l'épitope Flag reste accroché. Cependant, le protocole de purification établi pour produire les SHPR ne fait pas intervenir ce type de chromatographie d'affinité.

Nous avons donc envisagé d'éliminer la partie Flag de la séquence du SHPR190, et constaté sans surprise qu'elle ne participe pas de manière significative à l'activité antivirale du peptide inhibiteur dans des lignées cellulaires infectées.

b.2) La protéine SUMO-1 participe à l'activité inhibitrice du SHPR190

La protéine SUMO-1 avait été ajoutée dans l'objectif initial de stabiliser l'heptapeptide inhibiteur dans l'environnement extra- et intracellulaire. Cette protéine est abondante et ubiquitaire dans les cellules, qui ne seront logiquement pas affectées par un supplément en protéines SUMO apporté par les SHP (Roisin et al., 2004). Par ailleurs, le motif diglycine carboxy-terminal de SUMO-1, qui est rapidement clivé pour permettre sa conjugaison avec un substrat et qui constitue le site de coupure lors de la désumolyation, a été muté de manière à éviter une dégradation massive des SHP par les nombreuses protéases cellulaires spécifiques de SUMO.

Nous avons regardé si SUMO-1 peut être éliminée de la séquence du SHPR sans affecter son activité. Un peptide linéaire dépourvu de la séquence de SUMO-1 a été synthétisé puis testé directement sur des cellules infectées. De manière très inattendue, l'élimination de la protéine SUMO-1 abolit complètement l'action du SHPR. En effet, un test sur la réplication virale

comparant le SHPR sauvage et le peptide sans SUMO-1 a indiqué que seul le SHPR complet est capable d'inhiber la réplication virale, le peptide ne montrant toujours aucune activité 10 jours après l'infection (non illustré). La protéine SUMO-1 soutient donc fortement les propriétés inhibitrices du SHPR, et doit être présente dans la molécule.

b.3) Le domaine GAD et le motif de pénétration PTD ne peuvent pas être éliminés complètement de la séquence du SHPR190

Le SHPR190 possède un fragment de séquence correspondant au domaine GAD (*Gal4 Activation Domain*). Ce domaine fait partie de la molécule utilisée comme « proie » lors du criblage en double hybride chez la Levure, qui a permis d'identifier les peptides interagissant avec Rev (Roisin et al., 2004). Il se situe donc en amont de la séquence heptapeptidique, et a été jusqu'à présent conservé dans les molécules SHP. Il est probable que cette région puisse être éliminée du SHP sans perturber ses caractéristiques, puisqu'elle n'a *à priori* aucun rôle dans les propriétés inhibitrices du peptide. Nous avons délété la séquence complète de GAD (10 résidus) (ΔG), et testé cette mutation seule ou en combinaison avec d'autres mutations ponctuelles de l'heptapeptide 190.

D'après le test d'activité de Rev utilisant le plasmide rapporteur pDM128, la délétion complète du domaine GAD renforce le pouvoir inhibiteur du SHPR, qui est alors capable de réprimer fortement l'expression de l'enzyme CAT (Figure 49(A), pistes 3 et 10). Toutefois, le test utilisant le second système rapporteur montre que ce mutant, bien que légèrement actif, n'est pas capable d'inhiber efficacement l'expression de la GFP et donc l'activité de Rev (Figure 49(C), pistes 2 et 3). Par ailleurs, cette délétion combinée à une mutation ponctuelle m1, m4 ou m6 ne renforce pas le pouvoir inhibiteur du SHPR (Figure 49(A), pistes 7, 8 et 9 ; Figure 49(C), pistes 4 et 5).

De la même manière, et bien que ce motif soit utile pour la libération des SHP dans les cellules, nous avons étudié l'effet d'une délétion complète ou partielle du domaine de pénétration (ΔPTD et ΔQ) sur l'activité du SHPR190 (cf. mutants en Figure 47).

Nous observons que l'élimination complète du PTD est défavorable à l'activité du SHPR190 (Figure 49(B), pistes 3 et 4), alors que la délétion des quatre résidus carboxy-terminaux semble plutôt favorable, puisque le mutant (ΔQ) est capable d'inhiber correctement la production d'enzyme CAT (Figure 49(B), comparer pistes 3 et 5) et de la GFP (Figure 49 (C), comparer pistes 2 et 8).

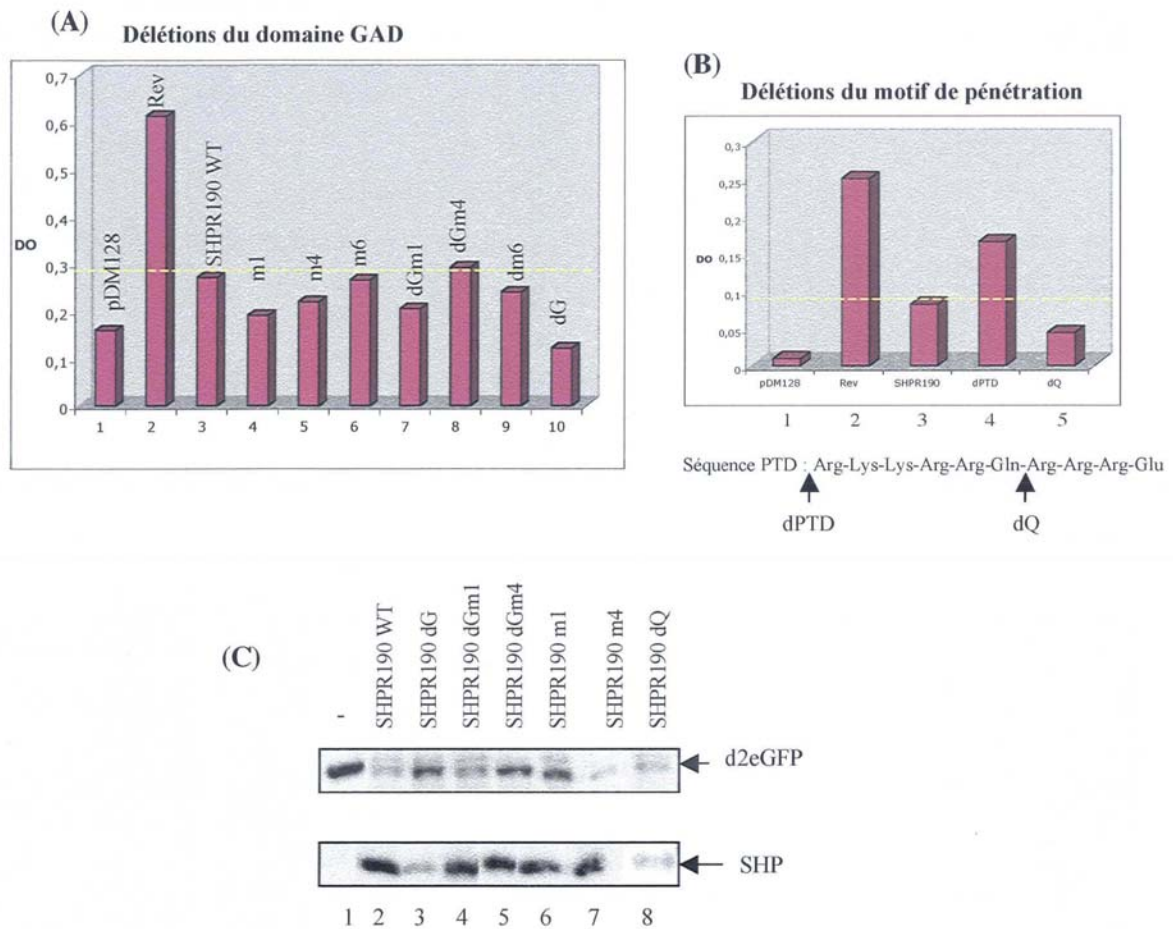


Figure 49 : Délétions totales ou partielles de la séquence GAD et du domaine de pénétration du SHPR190.

- (A) et (B) Les cellules HeLa ont été transfectées avec 100 ng de plasmide rapporteur pDM128 seul (piste 1) ou en présence de 10 ng de plasmide exprimant la protéine Rev (pistes 2 et suivantes), et associé à 200 ng de plasmide exprimant le SHPR190 sauvage (piste 3) ou délété du domaine GAD (graphe (A), pistes 7 à 10) ou délété dans le PTDT (graphe (B), pistes 4 et 5). 45 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été dosés pour leur concentration en enzyme CAT par test ELISA. Le graphe indique la valeur d'absorbance (DO) correspondant à la coloration d'un substrat spécifique modifié par l'enzyme CAT. Sous le graphe (B), la séquence sauvage du PTDT de Tat est indiquée et explique les différentes délétions.
- (C) Les cellules COS7 ont été co-transfectées avec 2 µg de plasmide rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev et 6 µg de plasmide contrôle pSG5 (piste 1) ou de plasmide exprimant le SHPR190 sauvage (piste 2) ou muté (pistes 3 à 8). 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été analysés par immunoprecipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP (panneau du haut) ou dirigé contre la protéine SUMO-1 (panneau du bas).

Puisqu'il paraît clair que la séquence GAD contribue à l'action inhibitrice du SHPR190, nous avons voulu déterminer les résidus de ce domaine qui sont importants pour l'efficacité de la molécule. Nous avons ainsi regardé s'il est possible d'éliminer quelques uns des résidus de la séquence GAD, en étudiant les propriétés inhibitrices de mutants possédant 7 ($\Delta G1$), 4 ($\Delta G2$)

ou 1 ($\Delta G3$) résidus en 3' de la séquence GAD (Figure 50 (A) et cf Figure 47). Les cellules COS7 transfectées par le vecteur rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev et l'un de ces mutants ont été directement analysées par cytométrie de flux pour leur niveau de fluorescence GFP (Figure 50(B)). Les résultats indiquent que seule la délétion de 6 résidus du domaine GAD ($\Delta G2$) permet d'augmenter l'action inhibitrice sur Rev (Figure 50(B), comparer rectangles « SHPR190WT » et « dG2 »). La séquence GAD ne peut donc être éliminée complètement, et il est préférable de conserver au moins les 4 résidus en 3' de la séquence.

c) Substitution de la cystéine dans SUMO-1 et combinaison de mutations

Comme déjà mentionné, les deux résidus cystéine présents dans l'heptapeptide 190 en position 4 et 5 (C132 et C133 dans la séquence SHPR190) peuvent former un pont disulfure qui pourrait compromettre l'activité du SHPR190. En ne conservant que la cystéine C133 (mutation m4), ce problème semble écarté. Cependant, la protéine SUMO-1 possède également une unique cystéine, située en position 68 dans la séquence du SHPR190 initial (cf. Figure 45). Il est donc probable que celle-ci forme un pont disulfure avec la cystéine 133, altérant ainsi la conformation adoptée par le SHPR190 et ses propriétés inhibitrices.

Nous avons substitué la cystéine de SUMO en un résidu alanine (C/A), dans la séquence SHPR190 sauvage et testé le variant obtenu avec le vecteur rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev. Nous avons ainsi observé que la substitution C/A confère un avantage à la molécule dans son action contre Rev (Figure 50(B), comparer rectangles « SHPR190 WT » et « C/A WT »).

Par contre, l'association de cette substitution avec la délétion des quatre résidus carboxy-terminaux du domaine GAD ($\Delta G2$) n'a pas un effet additif positif sur l'activité du SHPR190 (Figure 50 (B), rectangle « C/A dG2 »). De la même manière, il ne semble pas intéressant de combiner les mutations m1 et m4 dans l'heptapeptide 190 aux deux précédentes modifications, puisque les variants obtenus sont moins efficaces contre Rev que le SHPR190 sauvage (Figure 50(B), rectangles « C/A dG2 m1 » et « C/A dG2 m1m4 »).

(A)

Dénomination du mutant	Modification(s) de séquences
SHPR190 dG (=DG)	Délétion totale (10 résidus) du domaine GAD
SHPR190 dG1 (=DG1)	Délétion de 3 résidus en 5' de GAD
SHPR190 dG2 (=DG2)	Délétion de 6 résidus en 5' de GAD
SHPR190 dG3 (=DG3)	Délétion de 9 résidus en 5' de GAD
SHPR190 C/A WT	SHPR190 sauvage, mutation de la cystéine 68 (dans SUMO-1) en Alanine
SHPR190 C/A dG2	SHPR190 muté sur la cystéine 68 et délété de 6 résidus dans le domaine GAD
SHPR190 C/A dG2 m1	Idem ci-dessus, mais avec mutation m1
SHPR190 C/A dG2 m1m4	Idem ci-dessus, mais avec mutations m1 et m4

(B)

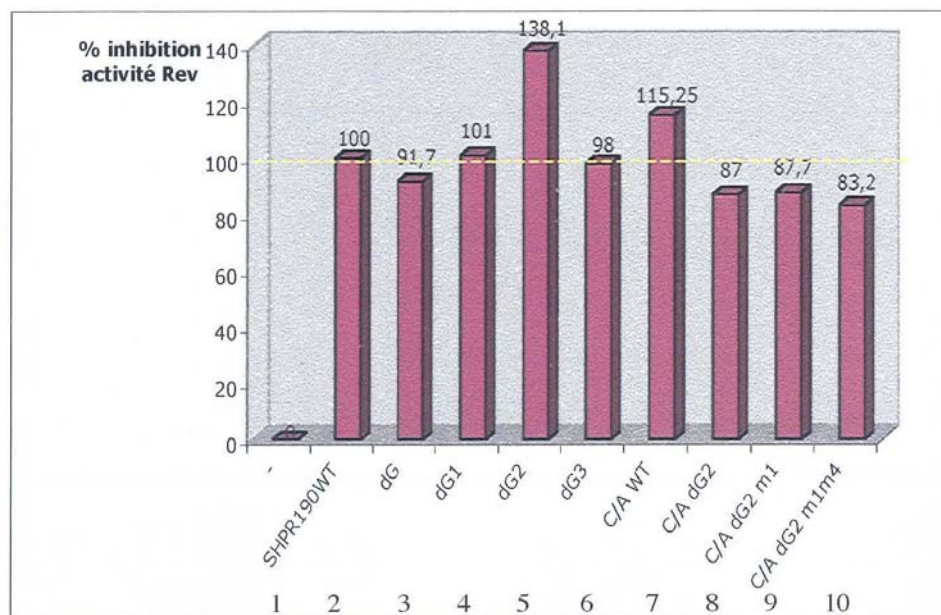


Figure 50 : Délétions partielles du domaine GAD et mutation de la cystéine 68.

(A) Liste des mutants étudiés dans ces expériences, expliquant les mutations de séquences réalisées.

(B) Les cellules COS7 ont été transfectées avec 2 mg de plasmide rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev, en absence (piste de gauche) ou en présence de 6 mg de plasmide exprimant le SHPR190 sauvage (piste 2) ou un mutant du SHPR190 (pistes suivantes). 42 heures après transfection, les cellules ont été récupérées puis lavées plusieurs fois, avant d'être analysées par cytométrie de flux pour leur niveau de fluorescence GFP. Le diagramme indique les taux d'inhibition de l'expression de la GFP, qui correspondent à l'inhibition de l'activité de Rev, en pourcentage par rapport au SHPR190 sauvage, dont l'efficacité d'inhibition a été arbitrairement définie à 100%.

d) Conclusions

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que le SHPR190 sauvage reste globalement le plus efficace en terme d'inhibition de la fonction Rev. En effet, les données obtenues à partir du système rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev, qui se rapproche des conditions rencontrées lors d'une infection par le HIV-1, montrent que certaines mutations prises individuellement semblent favorables, comme les mutations m4 ou C/A, ou la délétion $\Delta G2$. Cependant, la combinaison de ces mutations abolit leur effet positif, et le SHPR190 sauvage reste le plus actif pour bloquer la fonction Rev.

Plusieurs de ces molécules seront prochainement testées sur des cellules infectées, pour leur action contre la réplication du HIV-1 (par l'équipe de P. Clayette), ce qui permettra de mieux cerner l'efficacité antivirale de l'une ou l'autre des protéines SHPR.

Par ailleurs, d'autres caractéristiques sont à prendre en considération dans le choix d'une molécule thérapeutique. En particulier, celle-ci doit pouvoir atteindre sa cible cellulaire et intracellulaire sans l'aide d'adjuvants, qui peuvent se révéler toxiques pour l'organisme.

1.2.2. Optimisation de la pénétration intracellulaire du SHPR190

Pour étudier l'efficacité de pénétration des différents SHPR, nous avons préparé des lymphocytes à partir d'échantillons de sang humain. Nous avons placé ces cellules dans un milieu de culture (RPMI) contenant du sérum et des antibiotiques, et nous les avons activées par un traitement de 48 heures avec la PHA (*Phytohemagglutinin*) et l'interleukine 2. Nous avons ensuite mis en contact les lymphocytes avec 1 ou 2 μM de peptide SHP pendant 4 heures. Après lavages extensifs des cellules, nous avons réalisé des extraits cellulaires dans un tampon contenant des détergents et des inhibiteurs de protéases. Les extraits obtenus contiennent à la fois les fractions cytoplasmiques et nucléaires, mais excluent les membranes plasmiques. Cette lyse particulière permet d'éviter la détection artéfactuelle de protéines qui seraient accrochées sur la face externe de la membrane cellulaire ou coincées dans la bicouche lipidique. L'analyse par immunoempreinte de ces extraits à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1 révèle la présence ou non des SHP à l'intérieur des cellules.

Alternativement, nous avons observé des lymphocytes traités pendant 2 à 4 heures avec un SHP sur lequel a été greffé le fluorochrome Alexa 488. L'observation au microscope des

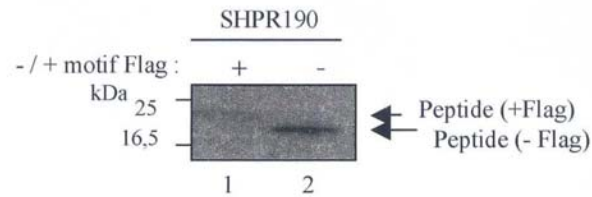
cellules vivantes, lavées et conservées dans un tampon artificiel (*HBS, Hepes Buffered Saline*), révèle ou non une fluorescence à l'intérieur des cellules.

a) Le motif Flag ne participe pas à la pénétration du SHPR190

Selon cette approche, nous avons regardé si l'élimination du motif Flag affecte la rentrée des SHP dans les cellules. Après contact entre les lymphocytes et des SHP ne comprenant plus le motif Flag, l'immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1 montre une nette pénétration du peptide sans motif Flag dans le milieu intracellulaire (Figure 51 (A), piste 2). L'absence de ce motif semble même renforcer la capacité d'internalisation du peptide (Figure 51 (A), comparer pistes 1 et 2).

Ces résultats sont confirmés par la microscopie de cellules vivantes préalablement incubées avec un SHP sans Flag fluorescent, puisque la molécule sans Flag est également détectée à l'intérieur des cellules (Figure 51 (B), images du milieu). L'efficacité du marquage avec le fluorochrome n'étant pas absolue, il est possible que les cellules n'émettant pas de signal fluorescent contiennent des molécules de SHPR non marquées. Ceci pourrait expliquer le marquage non uniforme des cellules, et rend impossible la comparaison de l'efficacité des peptides avec ou sans Flag.

(A)



(B)

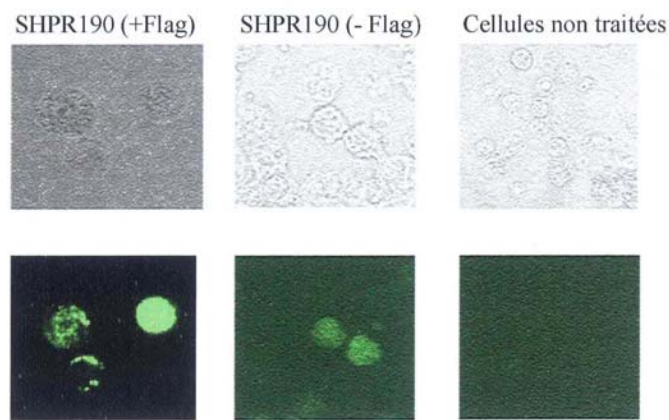


Figure 51 : Le motif Flag ne participe pas à la pénétration des SHP dans les cellules.

- (A) Les lymphocytes prélevés de sang humain et activés ont été incubés pendant 4 heures avec 2 μ M de SHPR190 avec (piste 1) ou sans le motif Flag (piste 2). Après lavages intensifs des cellules, des extraits cellulaires ont été réalisés dans un tampon contenant des détergents et des inhibiteurs de protéases, afin de récupérer la fraction intracellulaire. Des quantités égales d'extraits ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1.
- (B) Les lymphocytes activés ont été traités pendant 2 heures avec 4 μ M de SHPR190 avec Flag (images de gauche) ou sans Flag (images au centre), et fusionné au fluorochrome Alexa488. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle (images de droite). Après lavages intensifs, les lymphocytes ont été placés dans un milieu artificiel (*Hepes-Buffered-Saline, HBS*) et ont été déposés sur une lame en verre recouverte de polylysine pour permettre leur adhérence. Les observations ont été réalisées par microscopie confocale, en transmission (images du haut) ou en fluorescence (images du bas).

b) Le motif diglycine de la protéine SUMO-1 doit être muté

De la même manière, nous avons étudié si la présence du motif diglycine dans la protéine SUMO-1 pouvait affecter la pénétration du SHPR190. En effet, il serait possible de simplifier

la molécule finale en s'affranchissant de la mutation des deux glycines carboxy-terminales de la protéine SUMO-1.

Nous avons réalisé des extraits de lymphocytes incubés avec le SHPR190 sauvage ou un peptide similaire mais possédant le motif diglycine intact dans la séquence de SUMO-1 ainsi que le motif HA à son extrémité carboxy-terminale (SUMO-190-PTD-HA). L'analyse par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps dirigé contre SUMO indique que seul le SHPR190 sauvage pénètre efficacement dans les cellules (Figure 52 (A), comparer pistes 1 et 2). De la même manière, le peptide n'est pas détecté à l'intérieur des cellules par microscopie de fluorescence (Figure 52 (B), images du bas).

Ces observations suggèrent que le motif diglycine de la protéine SUMO-1 doit être muté pour permettre au SHP de rentrer de manière efficace dans les cellules. Il est probable que la présence de ces deux glycines déstabilise la molécule, qui pourrait être clivée avant même d'atteindre sa cible cellulaire.

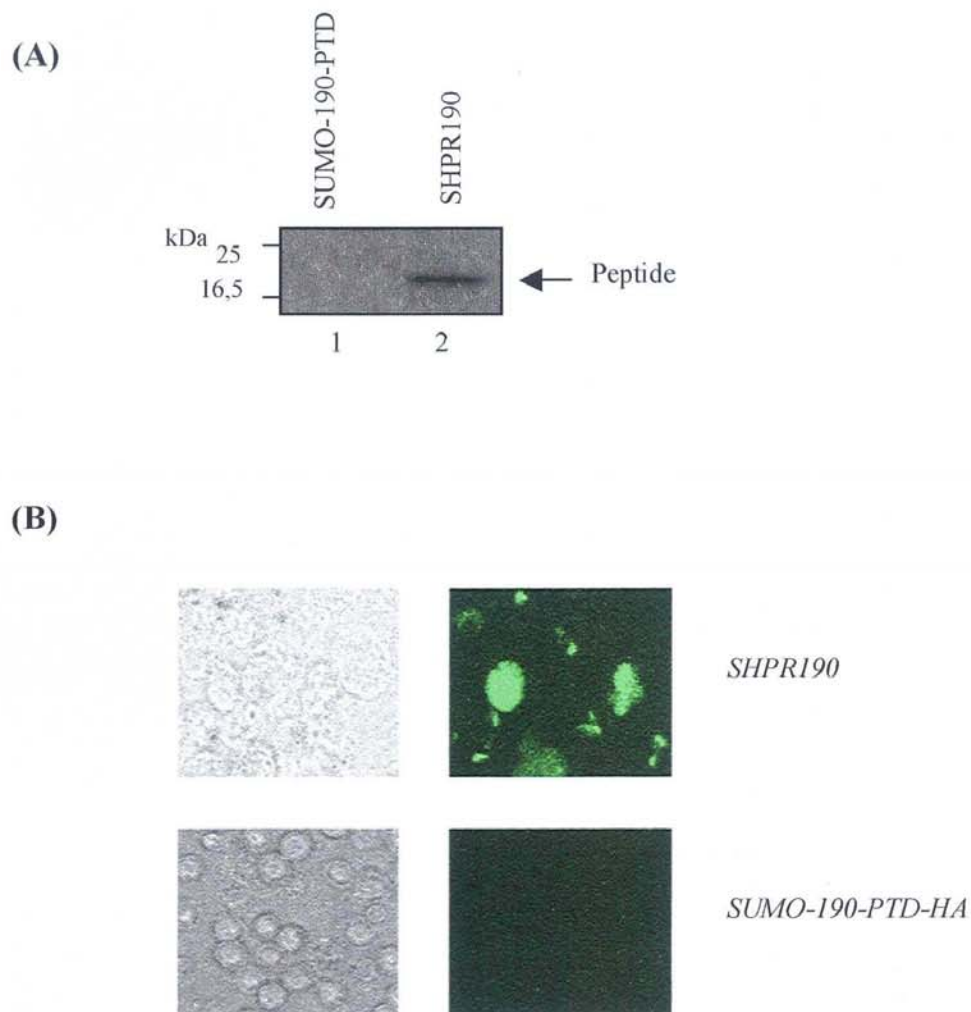


Figure 52 : La mutation du motif diglycine de la protéine SUMO-1 est essentielle à l'internalisation du SHPR190.

- (A) Les lymphocytes activés ont été mis en contact 4 heures avec 2 μ M de peptide possédant les deux glycines carboxy-terminales de SUMO-1 (SUMO-190-PTD) sans le motif Flag (piste 1), ou de SHPR190 sans Flag (piste 2). Les extraits cellulaires ont été réalisés dans un tampon contenant des détergents et des inhibiteurs de protéases, afin de récupérer la fraction intracellulaire. Des quantités égales d'extraits ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1.
- (B) Les lymphocytes activés ont été traités pendant 2 heures avec 4 μ M de SHPR190 (images du haut) ou de peptide SUMO-190-PTD-HA (motif HA fusionné à l'extrémité carboxy-terminale) (images du bas), ne possédant plus le motif Flag et fusionnés au fluorochrome Alexa488. Après lavages intensifs, les lymphocytes ont été placés dans un milieu artificiel (HBS) et ont été déposés sur une lame en verre recouverte de polylysine. Les observations ont été réalisées par microscopie confocale, en transmission (images de gauche) ou en fluorescence (images de droite).

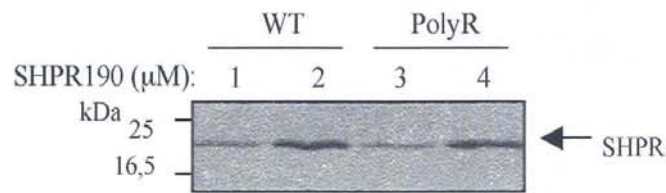
c) Mutagenèse du domaine de pénétration (PTD)

Les résultats apportés par les tests d'inhibition de la fonction Rev ont indiqué que la substitution du domaine basique par un motif polyarginine pourrait favoriser l'activité du SHPR190. Afin de vérifier si cette modification de séquence affecte le pouvoir pénétrant de la molécule, nous avons mis en contact des lymphocytes avec le SHPR190 sauvage ou possédant le motif polyarginine (PolyR), puis réalisé des extraits cellulaires.

L'analyse par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps dirigé contre SUMO-1 montre que les deux peptides pénètrent dans les cellules avec la même efficacité (Figure 53 (A), comparer pistes 1, 2 et 3, 4).

Ces résultats ont été confirmés par microscopie de cellules vivantes, puisque nous observons la pénétration de chaque peptide marqué par l'Alexa488 dans les lymphocytes (Figure 53 (B)). L'absence de fluorescence dans de nombreuses cellules provient probablement d'un marquage non exhaustif du SHPR190 PolyR, et il est impossible dans ces conditions de quantifier son efficacité de pénétration par rapport au SHPR190 sauvage. Par ailleurs, nous avons vérifié que les peptides visualisés se situent effectivement à l'intérieur de cellules vivantes, par un marquage des noyaux à l'iodure de propidium. En effet, un traitement de 20 minutes avec 2 μ M de ce produit, préalablement à l'observation des cellules, permet de visualiser les cellules mortes ou dont les membranes sont endommagées, puisqu'elles montreront un marquage intense de leur noyau. Les cellules transduites par les SHP sont négatives pour la coloration à l'iodure de propidium (Figure 53 (B), images de droite), ce qui indique leur bonne viabilité au moment de l'observation par microscopie.

(A)



(B)

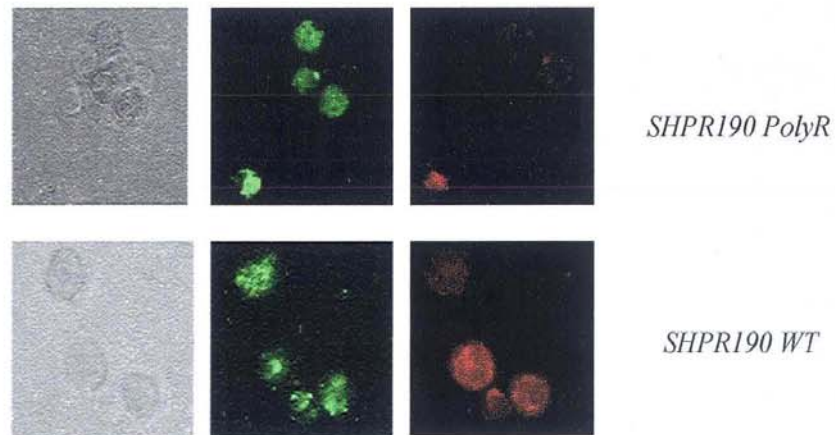


Figure 53 : La substitution du PTD de Tat par un motif polyarginine n'affecte pas le pouvoir pénétrant du SHPR190.

- (A) 1 ou 2 μ M de SHPR190 sauvage (pistes 1 et 2) ou de SHPR190 possédant le motif polyarginine à la place du PTD de Tat (PolyR) (pistes 3 et 4) ont été incubés avec des lymphocytes activés durant 4 heures. Des quantités égales d'extraits cellulaires ont été déposées pour l'immunoempreinte utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1.
- (B) Les lymphocytes activés ont été traités pendant 2 heures avec 1 μ M de SHPR190 sauvage (images du bas) ou de SHPR190 PolyR (images du haut) ne possédant pas le motif Flag et fusionnés au fluorochrome Alexa488. Les lymphocytes ont été lavés puis placés dans un milieu artificiel (*HBS*) et déposés sur une lame en verre recouverte de polylysine. Les observations ont été réalisées par microscopie confocale, en transmission (images de gauche), en fluorescence verte (images au centre), ou en fluorescence rouge, qui indique la coloration des noyaux (images de droite). Un marquage intense de ces noyaux correspond à des cellules mortes ou endommagées.

D'après ces données, il semble donc possible de remplacer le domaine basique de Tat par un motif polyarginine sans affecter l'activité inhibitrice du SHPR190.

Afin d'appréhender la réalité de l'efficacité d'action du SHPR190 PolyR, nous avons utilisé la lignée de cellules COS7 exprimant de manière stable le vecteur pCEP4-d2eGFP-Rev. Ces cellules ont été incubées dans un milieu contenant du sérum et des antibiotiques et supplémenté avec différentes concentrations de SHPR190 sauvage ou possédant le motif polyR. Après quelques heures de contact, des extraits cellulaires ont été réalisés puis analysés par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre la GFP (Figure 54). Comme attendu, le SHPR190 pénètre dans les cellules et inhibe efficacement la production de GFP dépendante de Rev lorsque il est présent dans le milieu extracellulaire à des concentrations au moins égales à 4 μM (Figure 54, comparer pistes 8 avec 2 et 3). Le SHPT8 contrôle n'est pas capable d'agir contre Rev et n'affecte pas l'expression de la GFP (Figure 54, comparer pistes 8 et 7).

Dans ces conditions expérimentales spécifiques, nous observons que la substitution du PTD par le motif polyarginine n'améliore pas l'action du SHPR190. En effet, le peptide muté ne semble efficace qu'à fortes concentrations (6 μM), et reste quoiqu'il en soit moins actif que la molécule sauvage (Figure 54, comparer pistes 3 et 6). Ainsi, lorsque ces SHPR sont apportés par l'environnement extracellulaire, le SHPR190 initialement identifié semble le plus efficace dans l'inhibition de la fonction Rev.

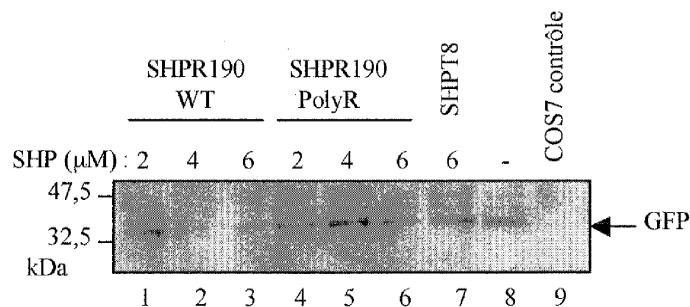


Figure 54 : Le SHPR190 inhibe efficacement l'expression de la GFP dépendante de Rev lorsqu'il est incubé avec des cellules exprimant constitutivement un plasmide rapporteur.

Les cellules COS7 exprimant de manière constitutive le plasmide rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev ont été incubées dans un milieu contenant du sérum, en l'absence (piste 8) ou en présence de 2, 4 ou 6 μM de SHPR190 sauvage (pistes 1 à 3) ou de SHPR190PolyR (piste 4 à 6) ou avec 6 μM de SHPT8 (piste 7). Au bout de 4 heures de contact, les cellules ont été lavées puis lysées dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases. Un extrait de cellules COS7 n'exprimant pas le plasmide rapporteur a été utilisé comme contrôle négatif de l'expression de la GFP. Des quantités égales d'extraits cellulaires ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP.

d) Conclusions

L'ensemble de ces expériences a permis d'évaluer l'importance des différentes régions de la séquence du SHPR190 pour sa pénétration dans les cellules. Nous avons en effet constaté qu'il est possible d'éliminer le motif Flag sans affecter le pouvoir pénétrant de la molécule, alors que la mutation des deux glycines carboxy-terminales de SUMO-1 est nécessaire à cette propriété. Nous avons également constaté que la substitution du PTD de Tat par un motif polyarginine n'affecte pas de manière drastique la rentrée du SHPR190 dans les cellules. Cependant, ce variant du SHPR190 s'avère moins efficace pour inhiber l'activité de Rev lorsqu'il est appliqué directement sur des cellules exprimant de manière stable le plasmide rapporteur pCEP4-d2eGFP-Rev.

Dans l'objectif d'optimiser l'action du SHPR190 initial, il semble donc envisageable d'éliminer le motif Flag, sans toucher à la partie SUMO-1 ni au domaine de pénétration.

1.2.3. Stabilité du SHPR190 et de ses variants

Un dernier point que nous avons voulu examiner a été de déterminer le niveau de production des protéines recombinantes exprimées en bactéries, ainsi que la faisabilité du protocole de purification initialement mis en place pour purifier les SHP. Par ailleurs, nous avons vérifié si les SHP produits restent stables pendant les étapes de purification puis lors des tests sur les cellules. En effet, si un peptide s'avère efficace dans son action contre Rev mais très instable et difficile à produire, il ne pourra être envisagé de perspectives thérapeutiques. La production en masse d'un tel candidat impliquerait en effet de lourdes dépenses matérielles et humaines, incompatibles avec une bonne stratégie thérapeutique.

a) Production des protéines recombinantes

Le protocole de purification élaboré permet une production relativement efficace et propre des SHP. Celui-ci fait appel à une résine d'héparine dont l'affinité pour les séquences basiques permet la rétention du SHP, qui sera libéré par une augmentation croissante de la concentration saline. La seconde étape permet une séparation des protéines selon leur taille (gel filtration). La dernière étape intervient pour éliminer les éventuels acides nucléiques accrochés au peptide, notamment à son domaine de pénétration basique, en les retenant sur une résine appropriée. A l'issue de ces trois étapes, le degré de purification obtenu est très satisfaisant, et les pertes protéiques restent raisonnables (environ un tiers de pertes à chaque étape) (Figure 55(A)).

Toutefois, nous observons un clivage du SHP assez important en terme quantitatif du SHP, dès lors de sa production en bactéries (Figure 55(A) et (B)). Des protéases cellulaires sont probablement capables de reconnaître une séquence dans le SHP, dégradant ainsi une partie des protéines néosynthétisées. Une analyse par spectrométrie de masse a révélé que le site de coupure se situe principalement entre les deux cystéines de l'heptapeptide (Figure 55(D), pic n°1). Dans une moindre mesure, ce clivage peut avoir lieu après les deux cystéines, voire même après la leucine en position 6 de l'heptapeptide (Figure 55(D), pics n° 2 et n°3).

Ces derniers résultats expliquent pourquoi les formes clivées sont séparées lors de l'étape de chromatographie sur colonne d'héparine (Figure 55(C)). En effet, la partie située en amont du site de coupure, comprenant la protéine SUMO-1 et un morceau de l'heptapeptide, est

éliminée par passage sur la résine, alors que le fragment situé en aval, qui contient le PTD, reste fixé. Ce dernier se retrouve donc avec les formes entières du SHP qui sont éluées de la colonne, mais il est majoritairement éliminé par l'étape de gel filtration.

Cependant, le clivage se poursuit tout le long de la purification, et les formes clivées réapparaissent rapidement (Figure 55 (C)). Malgré les différentes étapes de séparation, les formes clivées se retrouvent donc en quantité minime dans les préparations finales purifiées (Figure 55 (B)).

Toutefois, la forme clivée qui contient la protéine SUMO-1, bien visible sur le gel révélant le SHP purifié, ne semble pas affecter les propriétés inhibitrices observées dans l'ensemble des expériences réalisées dans le laboratoire ainsi que dans les tests sur la réplication virale effectués par l'équipe de Pascal Clayette. Il serait malgré tout intéressant en terme quantitatif de limiter au maximum le clivage de la molécule, afin d'optimiser le rendement de production des SHP. La mutation de la cystéine en position 4 dans l'heptapeptide pourrait répondre à cette attente, en modifiant la séquence reconnue par les protéases.

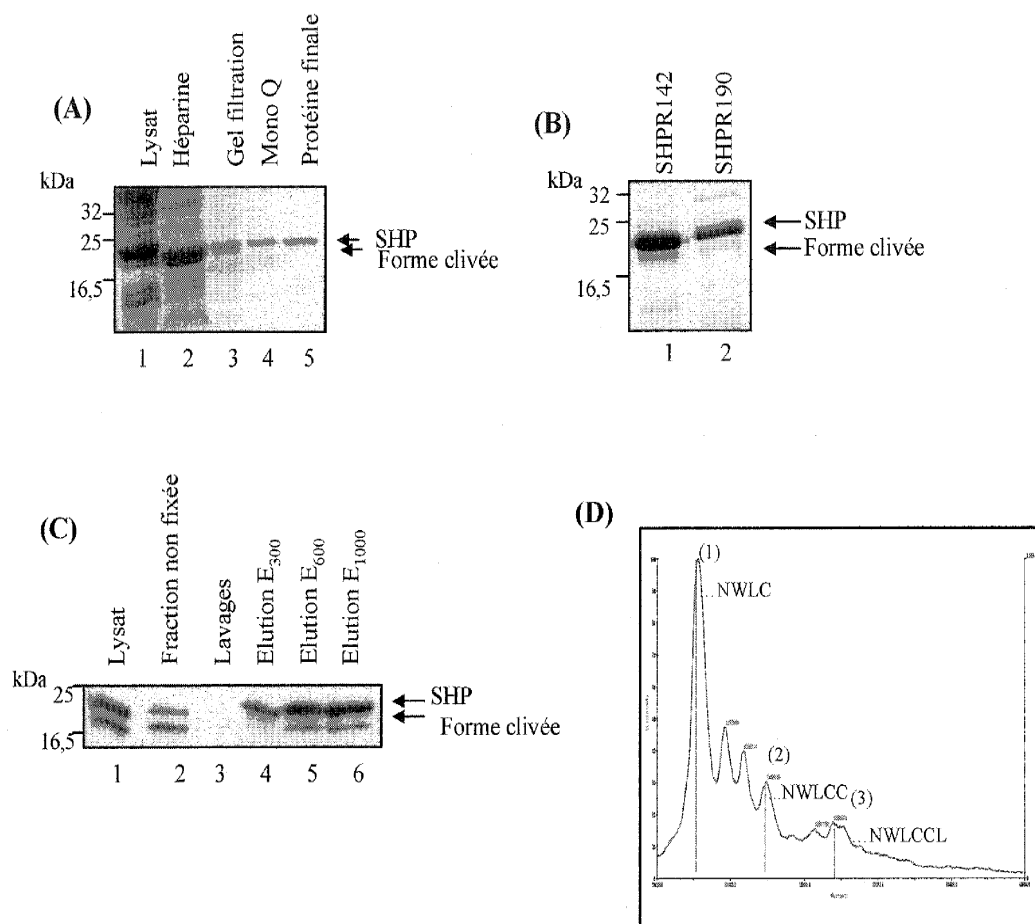


Figure 55 : Production et purification des SHP.

- (A) Une fraction des protéines recueillies après chaque étape du protocole de purification a été déposée sur gel SDS-PAGE, puis colorée au Bleu de Coomassie. Le lysat brut (piste 1) correspond aux protéines totales exprimées en bactéries. La colonne héparine permet de retenir les SHP (piste 2), puis la gel filtration sépare les protéines selon leur taille (piste 3). Une résine MonoQ fixe les éventuels acides nucléiques encore présents avec les SHP (piste 4). La protéine SHP finale est alors tamponnée et filtrée (piste 5).
- (B) Les SHPR142 (piste 1) et 190 (piste 2) purifiés sont légèrement contaminés par une forme clivée, correspondant à la protéine dépourvue du PTD et d'une partie de l'heptapeptide, visible par coloration au Bleu de Coomassie.
- (C) Un aliquot des différentes fractions recueillies lors de la colonne Héparine a été analysé par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1. Le SHPR190 subit un clivage dès l'étape de production en bactéries (piste 1). La colonne d'héparine permet de séparer la forme entière et la forme clivée, cette dernière n'étant pas retenue sur la résine (piste 2). Les éluions (pistes 3 à 6) permettent de recueillir le SHP entier, mais le clivage se poursuit et la forme clivée réapparaît.
- (D) Analyse par spectrométrie de masse des formes clivées du SHPR190, recueillies dans la solution protéique finale (en Figure B). Les 3 pics obtenus correspondent à des peptides de masse moléculaire différente, et traduisent des variations de poids correspondant à la délétion de X acides aminés. La séquence carboxy-terminale du SHPR190 est indiquée à côté de chaque pic (NWL...). Le clivage du SHPR190 intervient majoritairement après la cystéine 132 (pic 1), et dans une moindre mesure après la cystéine 133 (pic 2) ou après la leucine 134 (pic 3). D'autres pics sont obtenus, mais ils traduisent des modifications chimiques de la séquence, comme la méthylation ou l'acétylation.

b) Stabilité des SHPR dans le milieu extracellulaire

Afin d'évaluer la stabilité des SHPR dans le milieu extracellulaire, nous avons observé le comportement au cours de certaines expériences. En particulier, des cellules COS7 ont été incubées dans du milieu contenant du sérum et des antibiotiques en présence de 2 μ M de SHPR190 sauvage pendant 8 heures. Un aliquot du milieu de culture a été prélevé au moment de l'ajout du SHPR190 puis à différents temps jusqu'à récupération des cellules. Les aliquots ont ensuite été analysés par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1 (Figure 56). Nous observons ainsi que le SHPR190 se maintient stablement dans le milieu de culture pendant toute la durée de l'incubation (Figure 56, pistes 1 à 7). De la même manière, nous avons constaté de manière récurrente que les SHPR ne sont pas dégradés dans le milieu (non illustré). Ainsi, les SHPR purifiés restent stables dans le milieu extracellulaire et peuvent agir au moins à moyen terme contre la réplication virale.

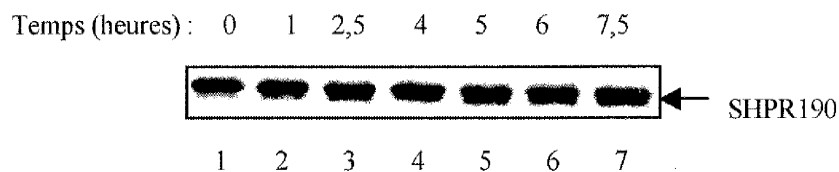


Figure 56: Le SHPR190 reste stable dans le milieu extracellulaire.

Les cellules COS7 ont été incubées dans un milieu de culture contenant du sérum et des antibiotiques en présence de 2 μ M de SHPR190 sauvage pendant 8 heures. Un aliquot du milieu de culture a été prélevé au moment de l'ajout du peptide (piste 1), puis à différents temps jusqu'à récupération des cellules (pistes 2 à 7). Des volumes égaux ont été analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine SUMO-1.

1.3. Mécanismes de pénétration du SHPR190

1.3.1. Etude de l'internalisation des SHP à travers la membrane cellulaire

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des SHPR et d'améliorer leurs propriétés, nous avons cherché à connaître comment ils traversent les membranes cellulaires pour

atteindre leur cible virale. En effet, l'étude des propriétés du domaine de pénétration de Tat (PTD) et de l'internalisation des SHPR pourra permettre de comprendre comment ils sont véhiculés jusqu'au noyau. Les résultats permettront éventuellement d'optimiser les propriétés intrinsèques du SHPR190 pour qu'il pénètre mieux.

Nous avons en particulier voulu savoir si la pénétration du SHPR190 fait intervenir les processus d'endocytose ou s'il s'agit d'un phénomène passif de diffusion à travers les membranes. En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'internalisation de cargos fusionnés au domaine de pénétration de Tat fait intervenir des phénomènes d'endocytose (Richard et al., 2003). En particulier, des travaux plus récents plébiscitent la participation d'une forme particulière d'endocytose, la macropinocytose (Wadia et al., 2004 ; Nakase et al., 2004). Ce processus consiste en une réorganisation du réseau d'actine pour permettre la formation d'une vésicule au niveau de la face externe de la membrane plasmique, qui est alors internalisée.

A l'inverse, d'autres travaux ont indiqué que le domaine basique de Tat pénètre majoritairement dans les cellules par diffusion passive à travers la bicouche lipidique (Thorèn et al., 2003).

D'après cette littérature, quelques controverses apparaissent quant au processus utilisé par le PTD de Tat pour atteindre le milieu intracellulaire. Sa petite taille soutient l'hypothèse d'une rentrée passive à travers les membranes, mais n'exclut pas la participation de l'endocytose. Par ailleurs, la controverse persiste lorsque le PTD est fusionné à une molécule cargo, dont la taille et probablement d'autres attributs affectent certainement les propriétés de transduction.

Nous avons donc étudié le mécanisme de pénétration des SHP dans une lignée lymphoïde Jurkat, placée dans un milieu de culture complété avec du sérum et des antibiotiques. Nous avons incubé ces cellules dans des conditions de température normales c'est-à-dire à 37°C, ou à 4°C.

Nous avons également testé l'effet d'inhibiteurs de l'endocytose sur la pénétration des SHP : la Roténone et l'amiloride. Ces deux inhibiteurs ont été ajoutés aux cellules mises en culture dans un milieu artificiel HBS (*Hepes-Buffered Saline*) contenant du Glucose et des concentrations salines appropriées pour le maintien de la survie des cellules. La roténone est un inhibiteur hautement spécifique de la NADH déshydrogénase impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui induit l'inactivation du cytochrome c et prive la mitochondrie en ATP (Barrientos and Moraes, 1999). Par ailleurs, le remplacement du

glucose en désoxyglucose conduit également à la déplétion en ATP intracellulaire, ce qui bloque les phénomènes énergie-dépendants comme l'endocytose. L'amiloride perturbe les échanges Na^+/H^+ dans la cellule, ce qui bloque la macropinocytose, une forme d'endocytose particulière indépendante de récepteurs de surface cellulaire (Wadia et al., 2004).

Trente minutes après ces différents traitements, nous avons ajouté le SHPR190 ou le SHPT8 pendant 2 heures. Après lavages intensifs des cellules, nous avons réalisé des extraits cellulaires que nous avons analysés par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps dirigé contre la protéine SUMO (Figure 57).

De cette manière, nous observons que le SHPT8 s'accumule de manière efficace à l'intérieur des cellules placées dans le milieu artificiel, dépourvu de sérum (Figure 57 (A), comparer pistes 1 et 2). L'immunoempreinte utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre l'actine confirme qu'à quantités égales de cellules, la pénétration est beaucoup plus efficace dans le milieu sans sérum. En effet dans ce cas, la quantité de cellules déposées est plus faible, alors que le signal correspondant au SHP intracellulaire est plus fort (Figure 57 (B), piste 2). La concentration intracellulaire en SHPT8 est donc accrue lorsque le sérum est absent du milieu extracellulaire. Ces observations ont déjà été mentionnées dans la littérature (Wadia et al., 2004), et suggèrent que la présence de sérum sera un facteur d'impact négatif sur l'efficacité globale des SHPR.

La pénétration du SHPT8 n'est également pas affectée par la présence d'un des inhibiteurs de l'endocytose utilisés (Roténone ou Amiloride). En effet, le signal correspondant au SHPT8 accumulé dans les cellules est équivalent lorsque l'incubation a été effectuée dans le milieu HBS normal ou supplémenté avec un inhibiteur (Figure 57 (A), comparer piste 3 avec 4 et 5). Le signal légèrement diminué dans le cas avec l'amiloride provient probablement de la toxicité de cette molécule, qui a pu provoquer la mort de nombreuses cellules pendant l'expérience et limite ainsi le pourcentage de cellules effectivement transduites par le SHP (Figure 57 (A), piste 5).

De la même manière, nous observons que le SHPR190 pénètre de manière équivalente dans les cellules incubées à basse température ou en présence d'inhibiteurs de l'endocytose (Figure 57(B)). En effet, à quantités égales d'extraits cellulaires, comme l'indique l'immunoempreinte effectuée à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'actine (Figure 57 (B), panneau du bas), la concentration intracellulaire du SHPR190 ne dépend pas de la

température (Figure 57 (B), panneau du haut, comparer pistes 1 et 2). Par ailleurs, nous constatons que l'internalisation est plus efficace dans le milieu artificiel, ne contenant pas de sérum, que dans le milieu de culture classiquement utilisé (Figure 57 (B), comparer pistes 1 et 3).

De la même manière, nous observons que les signaux correspondant au SHPR190 sont équivalents dans les cellules incubées en l'absence ou en présence de Roténone (Figure 57 (B), comparer pistes 3 et 4).

L'ensemble de ces observations indique que les SHP partagent un mode de pénétration commun, qui n'implique pas des phénomènes actifs comme l'endocytose, mais plutôt une diffusion passive à travers la membrane.

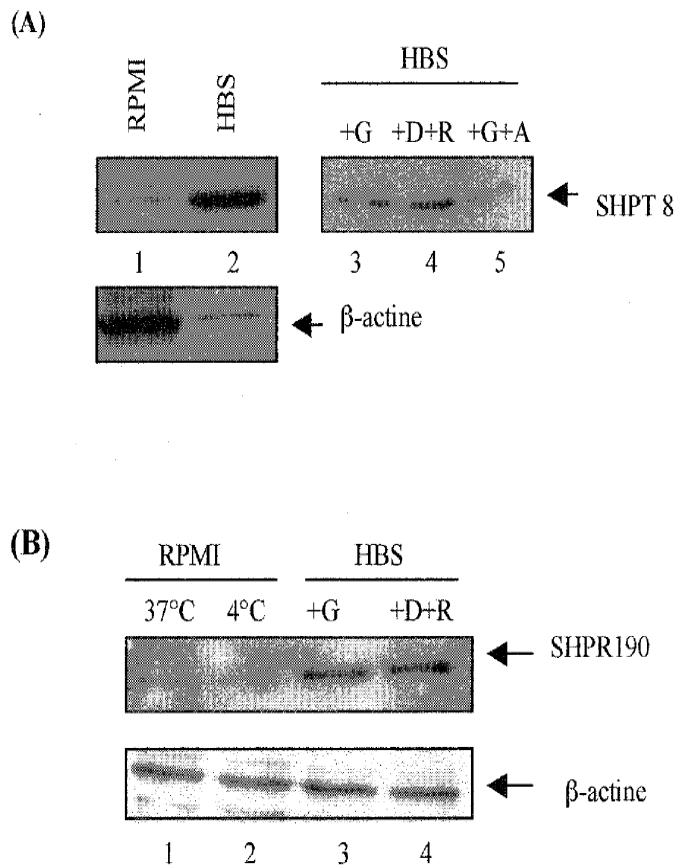


Figure 57 : La pénétration des SHP est affectée par la présence de sérum mais pas par une baisse de température ou par la présence d'un inhibiteur de l'endocytose.

- (A) Les cellules lymphoïdes Jurkat ont été incubées pendant 30 minutes dans du milieu de culture (RPMI) (piste 1) ou dans du milieu artificiel (HBS) contenant 10 mM de Glucose (pistes 2 et 3) ou contenant 10 mM de Déoxyglucose (D) et 1 μ M de Roténone (R) (piste 4) ou contenant 10 mM de Glucose et 5 mM d'Amiloride (A) (piste 5). 4 μ M de SHPT8 a ensuite été ajouté sur les cellules pendant 2 heures, puis des extraits cellulaires ont été réalisés. Des quantités égales d'extraits ont été analysées par immunoempreintes à l'aide des anticorps monoclonaux dirigés contre SUMO-1 (panneau du haut) ou contre la β -actine (panneau du bas).
- (B) Les cellules lymphoïdes Jurkat ont été incubées pendant 30 minutes dans du milieu de culture (RPMI) à 37°C (piste 1) ou à 4°C (piste 2), ou dans un milieu artificiel (HBS) contenant 10 mM de Glucose (G) (piste 3) ou contenant 10 mM de déoxyglucose (D) et supplémenté avec 1 μ M de Roténone (R) (piste 4). 2 μ M de SHPR190 sauvage a été ajouté sur les cellules pendant 2 heures, puis les extraits cellulaires ont été analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1 (panneau du haut). L'homogénéité des dépôts a été vérifiée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la β -actine (panneau du bas).

Afin d'étudier la distribution intracellulaire du SHPR190, nous avons observé des lymphocytes prélevés d'échantillons sanguins humains et activés, puis incubés à 37°C avec le SHPR190 fusionné à l'Alexa488 (Figure 58 (A)). Les cellules, placées dans le milieu HBS pour les maintenir vivantes le long de l'expérience, révèlent une fluorescence assez hétérogène. En effet, nous observons globalement une forte accumulation des SHPR dans le noyau des cellules (Figure 58 (A), images de gauche), mais les peptides sont également détectés sous forme de points dans le cytoplasme (Figure 58 (A), images de droite). Il est également possible de visualiser le peptide à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Figure 58 (A), images au centre). L'intensité du marquage dans le noyau étant relativement forte, il semble donc que le SHPR190 se dirige à partir du milieu extracellulaire jusqu'au noyau, où il s'accumule.

Afin de confirmer ces observations et de déterminer l'impact d'une baisse de température sur la répartition intracellulaire du SHPR190, nous avons réalisé un fractionnement sur des cellules mises en contact avec le SHPR190 dans le milieu HBS, à 37°C ou à 4°C. Nous avons ainsi séparé la phase nucléaire de la phase cytoplasmique, et différencié la fraction correspondant aux membranes cellulaires. L'immunoempreinte révélée par l'anticorps dirigé contre SUMO montre une forte accumulation du SHPR190 dans la fraction nucléaire lorsque les cellules ont été placées dans les conditions normales de culture (Figure 58 (B), piste 2). A 4°C, la distribution intracellulaire du SHPR190 est différente, et le peptide s'accumule dans la fraction cytoplasmique ainsi que dans les membranes plasmiques, au détriment de la fraction nucléaire (Figure 58 (B), comparer les pistes 1 et 2 avec les pistes 4 et 5). L'immunoempreinte réalisée à l'aide de l'anticorps dirigé contre la Ribonucléotide réductase valide la qualité de fractionnement entre noyau et cytoplasme (Figure 58 (B), panneau du bas).

Ces observations montrent que le peptide SHPR190 est capable de rentrer dans les cellules de manière indépendante de la température, et qu'il atteint efficacement le compartiment nucléaire lorsque les cellules sont placées à 37°C. Par contre, à 4°C, il ne semble pas être importé au noyau de manière efficace, supposant alors que les phénomènes d'import nucléaire font intervenir des processus dépendants de la température.

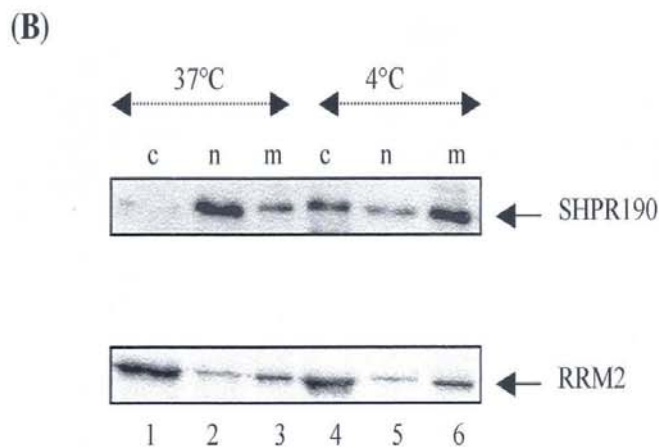
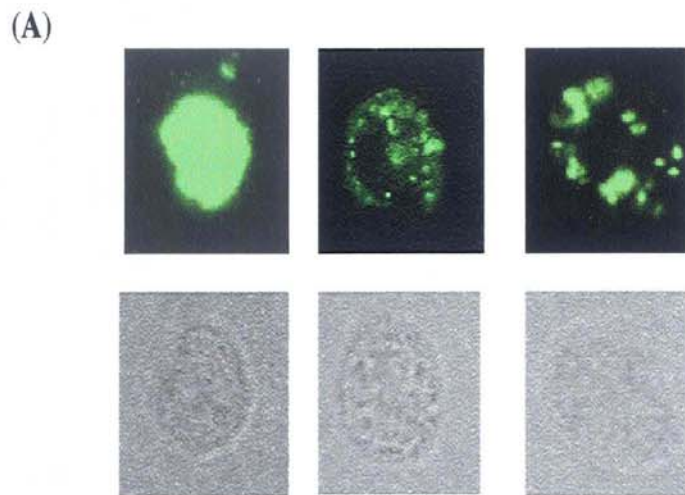


Figure 58 : La répartition du SHPR190 dans la cellule est affectée par une baisse de température.

- (A) Les lymphocytes activés ont été traités pendant 2 heures avec 1 μM de SHPR190-Alexa488 à 37°C, puis lavés et maintenus dans le milieu HBS. Les cellules ont été déposées sur une lame recouverte de polylysine puis analysées par microscopie confocale, en fluorescence verte (images du haut) ou en transmission (image du bas).
- (B) Les cellules lymphoïdes Jurkat ont été incubées dans le milieu HBS à 37°C ou à 4°C, trente minutes avant l'ajout de 2 μM de SHPR190 sauvage. Après 2 heures de contact à 37°C (pistes 1 à 3) ou à 4°C (pistes 4 à 6), les cellules ont été lavées, puis un fractionnement cellulaire a été réalisé pour séparer les phases cytoplasmique (c), nucléaire (n) et membranaire (m). Un aliquot de chaque fraction a été analysé par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1 (panneau du haut). La qualité de séparation entre phases nucléaire et cytoplasmique été évaluée par une immunoempreinte à l'aide de l'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine cytoplasmique ribonucléotide réductase (RRM2) (panneau du bas).

1.3.2. Analyse comparative de différents domaines de pénétration(PTD)

a) Choix des séquences de pénétration

Afin de déterminer comment le domaine basique de Tat contribue au passage des protéines à travers la membrane, nous avons cherché à déterminer si d'autres séquences, proches du PTD de Tat, peuvent permettre une rentrée plus efficace dans les cellules par une affinité plus forte pour les membranes cellulaires.

En effet, il a été montré que le pouvoir pénétrant du PTD de Tat lui est conféré d'une part par sa charge globalement positive, et d'autre part par sa conformation hélicoïdale (Schwarze et al., 2000). Selon cette hypothèse, des études ont indiqué qu'un peptide possédant des résidus alanine pour renforcer sa structure hélicoïdale pénètre mieux dans les cellules (Ho et al., 2001). Par ailleurs, des peptides de synthèse riches en arginine sont capables de rentrer efficacement dans les cellules, et en particulier des motifs de 8 à 10 arginines (Futaki et al., 2001 ; Fuchs and Raines, 2003 ; Thorèn et al., 2003).

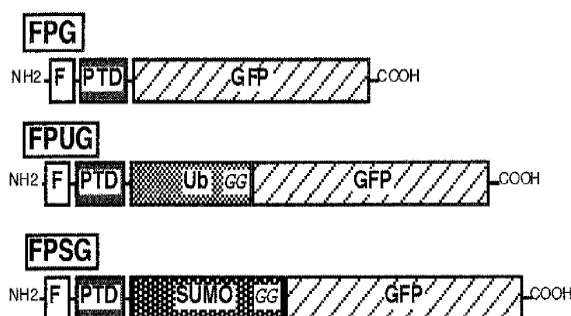
Cependant, selon certains auteurs, la charge positive des séquences PTD ne serait pas le seul attribut pour la pénétration dans les cellules, puisqu'ils ont montré qu'une séquence riche en résidus lysine est incapable d'atteindre efficacement le cytoplasme (Futaki et al., 2001 ; Thorèn et al., 2003). A l'inverse, des rapports montrent qu'un tel motif est efficace, voire plus actif que le PTD de Tat, pour transporter des grosses molécules comme la β -galactosidase (Mai et al., 2002) , ou lorsque la protéine fusion est dénaturée (Park et al., 2002).

D'après cette littérature, nous avons fusionné différentes séquences de 9 résidus à la protéine fluorescente GFP, et nous avons évalué leur affinité pour les membranes cellulaires. Nous avons également introduit l'ubiquitine ou la protéine SUMO-1, afin d'assurer la stabilité des protéines recombinantes dans les milieux extra- et intracellulaire. Par ailleurs, les deux glycines carboxy-terminales de l'ubiquitine et de SUMO-1 ont été conservées, dans l'objectif d'assurer un clivage de la molécule par les hydrolases cellulaires, pour libérer la GFP dans le milieu intracellulaire. Un tel clivage permettra de prouver la réelle pénétration de ces protéines dans la cellule.

Enfin, les protéines possèdent l'épitope Flag à leur extrémité amino-terminale, qui a été utilisé pour leur purification par chromatographie d'affinité (Figure 59 (A)).

En particulier, nous avons créé plusieurs séquences polyarginine de 9 (PTD5), 7 (PTD7) ou 11 (PTD8) résidus, une séquence polylysine (PTD9) et une séquence riche en alanine (PTD2). Deux séquences (PTD3 et PTD4) ont été adaptées de l'hélice alpha de l'ubiquitine et modifiées afin de renforcer leur caractère basique, à l'image du PTD, qui se rapproche de la séquence de Tat (Figure 59(B)).

(A)



(B)

<i>PTD</i>	<i>Séquence peptidique</i>	<i>Nature du PTD</i>
PTD1	SGRKKRRQRRRGG	Domaine basique de Tat HIV-1
PTD2	SARAAARQARAGG	Séquence riche en alanines (Hélice α)
PTD3	SKRLKARQARRGG	Séquence adaptée de l'hélice α de l'ubiquitine
PTD4	SERVKARIQRKGG	Séquence adaptée de l'hélice α de l'ubiquitine
PTD5	SGRRRRRRRRRGG	Séquence de 9 arginines
PTD6	SERRKARRQRRRGG	Séquence riche en arginines
PTD7	SGRRRRRRRGG	Séquence de 7 arginines
PTD8	SGRRRRRRRRRRRGG	Séquence de 11 arginines
PTD9	SGKKKKKKKKKGG	Séquence de 9 lysines

Figure 59 : Liste des protéines fusion créées pour l'étude des domaines de pénétration (PTD).

- (A) Représentation schématique des trois types de fusions réalisées. Celles-ci sont constituées de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*), choisie pour détecter les protéines par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique ou par microscopie. Elles possèdent également l'épitope Flag à leur extrémité amino-terminale, utilisé pour la purification des protéines par chromatographie d'affinité. Un domaine de pénétration (*Protein Transduction Domain, PTD*) a été inséré en aval de cet épitope, sauf pour les trois protéines contrôle, qui servent de témoin négatif dans les expériences (non décrites). L'ubiquitine (FPUG) ou la protéine SUMO-1 (FPSG), possédant leurs deux glycines carboxy-terminales, ont été insérées en amont de la protéine GFP, afin de stabiliser la protéine fusion et d'assurer un clivage dans les cellules pour libérer la GFP.
- (B) Le tableau indique les séquences peptidiques des différents PTD synthétisés (en gras). Les résidus entourant immédiatement les séquences (SX et GG) permettent une certaine flexibilité de la molécule finale.

b) Les domaines de pénétration adhèrent par affinité aux surfaces cellulaires

Ces différentes protéines ont été incubées avec des lymphocytes issus de sang humain, dans un milieu contenant du sérum et des antibiotiques. Après élimination de la protéine dans le milieu par lavages, les cellules ont été placées de nouveau dans le milieu pendant quelques heures, puis elles ont été lysées dans un tampon contenant une forte concentration en détergents, et en particulier du SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), mais ne permettant pas l'élimination des membranes cellulaires. Des quantités équivalentes d'extraits ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine GFP.

Nous avons tout d'abord constaté que l'activation des lymphocytes préalable à leur mise en contact avec les protéines renforce l'affinité de ces dernières pour les surfaces cellulaires (Figure 60 (A)). En effet, l'intensité du signal correspondant à la protéine présente avec les cellules est plus forte lorsque les cellules ont été activées avec la PHA et l'IL-2 (Figure 60(A), comparer panneaux du haut et du bas). Nous avons donc réitéré les expériences dans des lymphocytes activés, afin de mieux appréhender l'efficacité de chaque protéine.

Une première série d'expériences a été conduite sur les différentes formes contenant l'ubiquitine, afin d'étudier leur affinité pour les membranes cellulaires et de déterminer si la libération attendue de la GFP dans le milieu intracellulaire a bien lieu. Nous constatons qu'une petite partie des protéines est détectée avec les fractions cellulaires (C), tandis que la majorité reste dans le milieu extracellulaire (M) (Figure 60(B)). La présence des protéines dans les extraits cellulaires totaux est associée au domaine de pénétration, puisque la forme sans PTD n'est pas détectée dans ces fractions (Figure 60 (B), piste 3).

Par ailleurs, nous observons que le clivage pour libérer la GFP a déjà lieu dans le milieu extracellulaire (Figure 60 (B), pistes 1, 4, 7 et 10). A l'inverse, aucune forme libre de la GFP n'est détectée dans les fractions cellulaires, indiquant que les protéines fusions ne sont pas véritablement internalisées (Figure 60 (B), pistes 6, 9 et 12).

Ces premières observations montrent que la présence d'un PTD contribue à l'adhérence des protéines sur les membranes cellulaires, mais qu'elle ne permet pas leur internalisation.

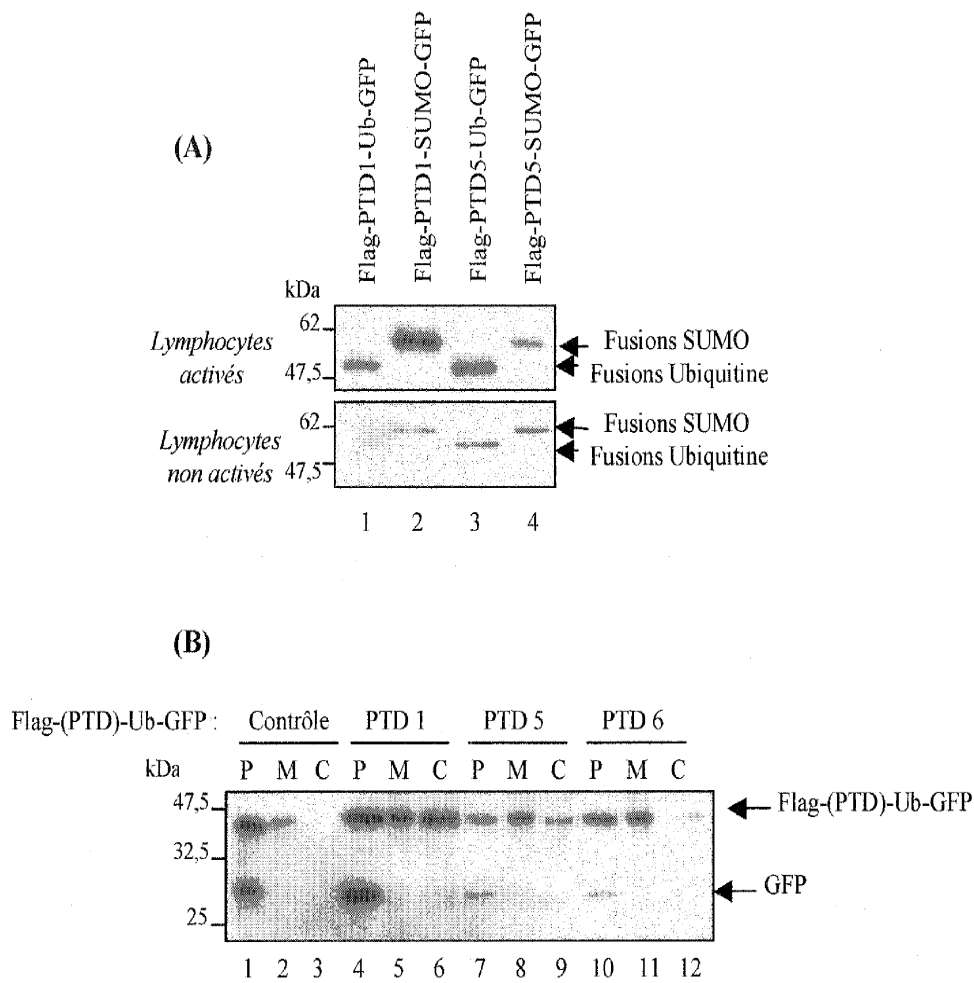


Figure 60 : Les protéines possédant un domaine de pénétration sont présentes dans des extraits cellulaires totaux.

- (A) Les protéines PTD-GFP s'accumulent préférentiellement dans les lymphocytes activés. Les lymphocytes issus de sang humain ont été activés (panneau du haut) ou non (panneau du bas) pendant 48 heures avec la PHA et l'IL-2, avant d'être mis en contact 2 heures avec 0,5 μ M de protéine Flag-PTD1-Ub-GFP (piste 1), Flag-PTD1-SUMO-GFP (piste 2), Flag-PTD5-Ub-GFP (piste 3) ou Flag-PTD5-SUMO-GFP (piste 4). L'immunoempreinte a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP.
- (B) Les lymphocytes activés ont été incubés pendant 1 heure avec 0,5 μ M de protéine Flag-Ub-GFP contrôle (pistes 1 à 3), ou possédant le PTD1 (pistes 4 à 6), le PTD5 (pistes 7 à 9) ou le PTD6 (pistes 10 à 12). Après lavages, les cellules ont été remises en culture pendant 4 heures. Des extraits cellulaires (C) ont ensuite été réalisés dans un tampon riche en SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), puis directement déposés sur gel SDS-PAGE pour une analyse par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP. Un aliquot de chaque protéine avant dépôt (P) et dans le milieu de culture récupéré après l'incubation de 1 heure (M) a également été analysé.

c) Comparaison de l'affinité des différents PTD pour les membranes cellulaires

Selon le même protocole que précédemment, nous avons étudié l'affinité des différentes protéines de fusion pour les membranes cellulaires.

Les expériences avec les protéines PTD-Ubiquitine-GFP indiquent que le PTD1, correspondant à la séquence basique de Tat, a la plus forte affinité pour les surfaces cellulaires (Figure 61 (A), piste 1 ; et aussi cf. Figure 60 (B), piste 6). Les domaines PTD 2, 3, 4, 8 et 9 n'adhèrent pas ou peu (Figure 61 (A), pistes 5, 6 et 7, et non illustré), alors que les PTD 5, 6 et 7 ont une affinité proche de celle du domaine basique de Tat (Figure 61 (A), pistes 2, 3 et 4).

Les expériences utilisant les fusions PTD-SUMO-GFP indiquent également que le PTD de Tat possède l'affinité pour les membranes la plus élevée (Figure 60 (B), piste 1). Par ailleurs, les PTD 5 et 9 semblent également adhérer efficacement aux surfaces cellulaires (Figure 60 (B), pistes 2 et 7).

Les expériences conduites avec les fusions PTD-GFP indiquent des résultats similaires que précédemment (Figure 61 (C)).

Pour chacune de ces expériences, nous avons réalisé une immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'actine, afin de vérifier l'homogénéité des dépôts cellulaires analysés (Figure 61 (A), (B) et (C), panneaux du bas). Le signal homogène révélé confirme que les variations d'intensité des signaux correspondant aux protéines sont bien dues à des différences d'affinité des PTD pour les surfaces cellulaires.

Ainsi, des séquences de 7 ou 9 arginines ont relativement une bonne affinité pour les membranes cellulaires, mais l'ajout de 2 arginines supplémentaires semble abolir cette propriété. L'augmentation de la longueur de la chaîne polyarginine, pour accroître son caractère basique, ne semble donc pas permettre de renforcer l'affinité du PTD pour les membranes.

Par contre, le PTD6, riche en résidus basiques, adhère globalement bien aux surfaces cellulaires.

De la même manière, le renforcement de la structure hélicoïdale n'améliore pas l'affinité du PTD pour les cellules (PTD2), tout comme l'utilisation des séquences PTD3 et PTD4 adaptées de l'hélice alpha de l'ubiquitine.

Par contre, le motif polylysine, qui conserve une charge positive à l'image des arginines, semble pouvoir s'associer efficacement aux surfaces cellulaires.

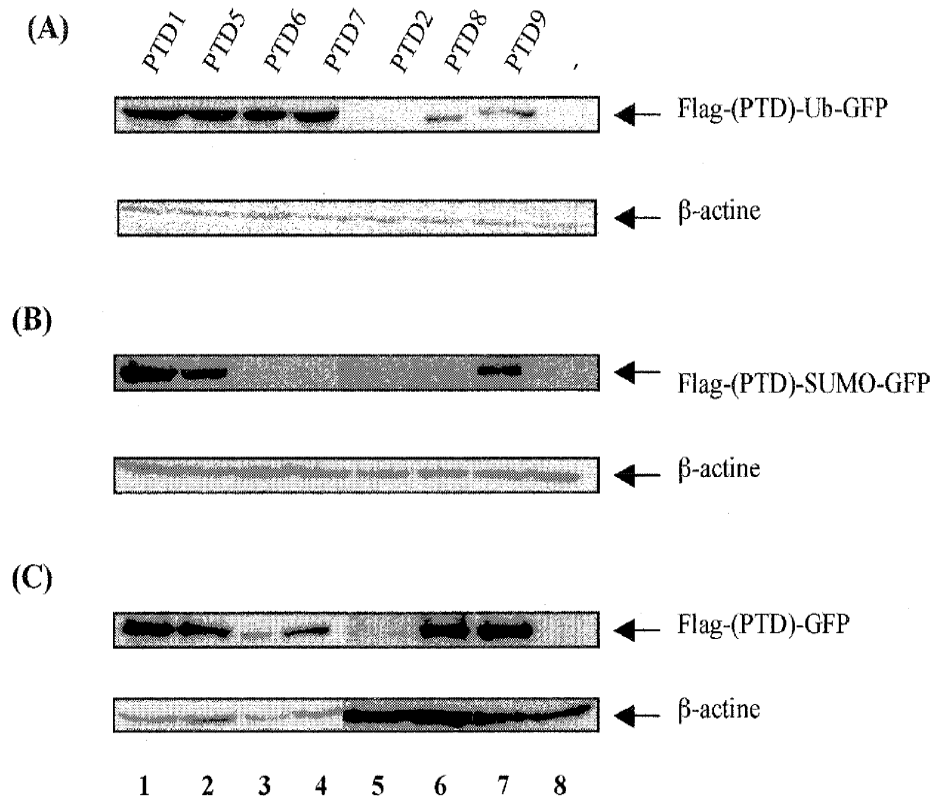


Figure 61 : Efficacité des différents domaine de pénétration.

Les lymphocytes activés ont été incubés pendant 1 heure avec $0,5 \mu\text{M}$ des protéines Flag-Ub-PTD-GFP (A) ou Flag-PTD-SUMO-GFP (B), ou Flag-PTD-GFP (C). Après lavages, les cellules ont été remises dans le milieu de culture durant 4 heures, puis ont été lysées dans un tampon riche en SDS. Les extraits ont été directement déposés sur gel SDS-PAGE pour une immunoempreinte à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la GFP (panneaux du haut) ou contre la β -actine (panneaux du bas). Les protéines contrôle (piste 8), ou possédant respectivement le PTD1 (piste 1), le PTD5 (piste 2), le PTD6 (piste 43), le PTD7 (piste 4), le PTD2 (piste 5), le PTD8 (piste 6), ou le PTD9 (piste 7) ont été testées. Les PTD 3 et 4 ont été testées uniquement dans les protéines Flag-PTD-Ub-GFP, et n'ont pas montré d'efficacité de transduction (non illustré). Ces domaines n'ont donc pas été insérés dans les fusions Flag-GFP et Flag-SUMO-GFP.

d) Les protéines fusion adhèrent aux surfaces cellulaires mais ne pénètrent pas dans le cytoplasme

Malgré les différences d'efficacité de pénétration observées de manière récurrente, plusieurs évidences indiquent qu'aucune protéine n'est effectivement présente à l'intérieur des cellules. En effet, nous avons vu que le clivage par des hydrolases cellulaires, prévu pour libérer la protéine GFP à l'intérieur des cellules, n'a pas lieu (cf. Figure 60 (B)).

Par ailleurs, nous avons réalisé des extraits de cellules, après mise en contact avec les protéines et lavages, à l'aide d'un tampon permettant d'extraire la fraction intracellulaire en excluant les membranes plasmiques. Les observations indiquent une pénétration minimale des protéines à l'intérieur des cellules, alors que ces dernières sont bien visibles dans des extraits cellulaires totaux (Figure 62(A), comparer pistes 1, 2 avec 3, 4 et pistes 5, 6 avec 7, 8).

Nous avons également observé des cellules vivantes préalablement incubées avec les trois protéines possédant le domaine basique de Tat (PTD1) par microscopie. Les images révèlent des amas de cellules mortes auxquels sont associées des protéines, qui n'ont pas pu être éliminées correctement lors des étapes de lavage (Figure 62(B)). Les protéines semblent donc pouvoir s'accrocher aux surfaces cellulaires, mais elles ne pénètrent pas réellement à l'intérieur des cellules et seront décrochées des cellules lors des lavages effectués avant la microscopie.

La protéine sans PTD n'est pas détectée sur les cellules, ce qui indique que le PTD est bien responsable de l'adhérence sur les surfaces cellulaires. Plusieurs auteurs ont proposé que l'interaction entre les composants chargés négativement de la membrane plasmique et les motifs de pénétration est l'étape primaire intervenant dans le phénomène de transduction (Vivès, 2003 ; Lundberg et al., 2003). Selon un tel scénario, les protéines fusion sont effectivement capables de s'associer avec les membranes cellulaires grâce au domaine PTD. Cependant, ce dernier ne permet pas aux protéines d'atteindre le milieu intracellulaire.

Ainsi, les données récurrentes observées par immunoempreintes sont uniquement le résultat d'une affinité plus ou moins forte des séquences PTD pour les membranes cellulaires. Toutefois elles permettent d'appréhender les caractéristiques des domaines de transduction

qui sont importantes pour promouvoir la rentrée dans les cellules, par une affinité plus forte avec les membranes cellulaires.

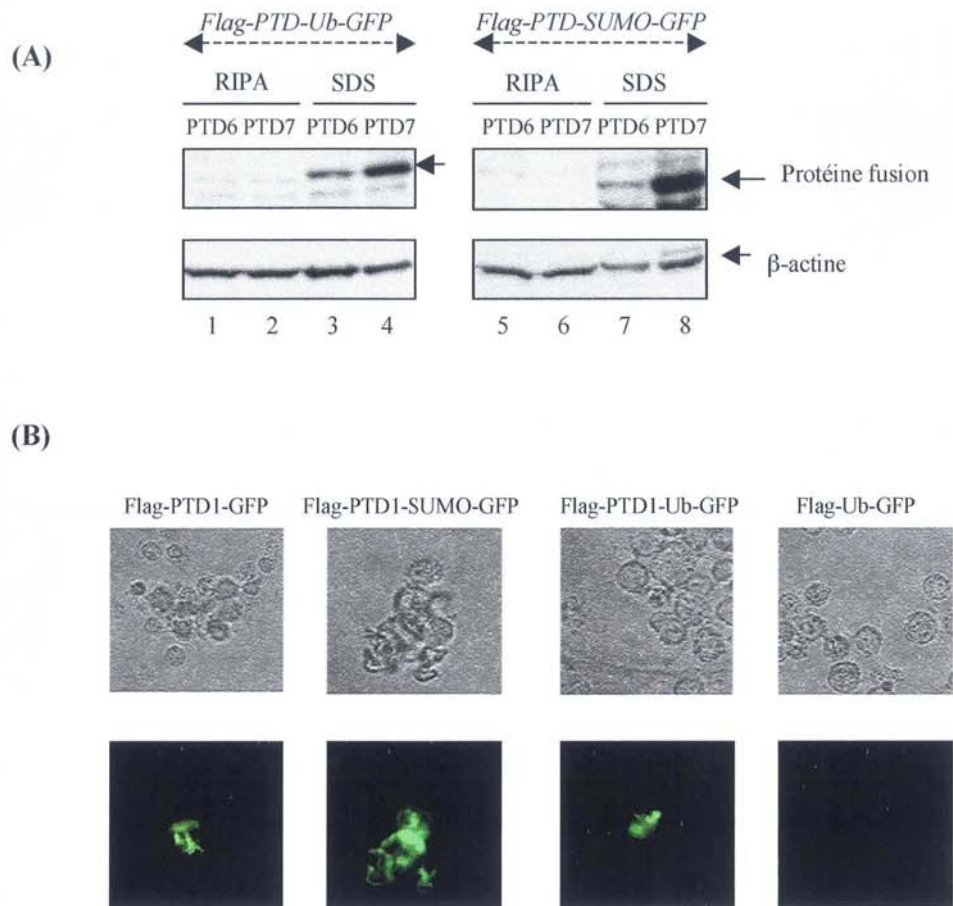


Figure 62 : Les protéines fusion PTD-GFP ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules mais adhèrent fortement à la membrane plasmique.

- (A) Les lymphocytes activés ont été incubés avec 0,5 μM de protéine Flag-PTD-Ubiquitine-GFP (pistes 1 à 4) ou Flag-PTD-SUMO-GFP (pistes 5 à 8) pendant 4 heures, puis lavées extensivement. Les cellules ont été lysées avec un tampon SDS pour obtenir des extraits cellulaires totaux (pistes 3, 4, 7 et 8) ou avec un tampon RIPA pour récupérer la fraction intracellulaire et éliminer les membranes plasmiques (pistes 1, 2, 5 et 6). Ces extraits ont été analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GFP (panneau du haut). L'homogénéité des dépôts a été vérifiée par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la β -actine (panneau du bas).
- (B) Les lymphocytes activés ont été incubés avec 2 μM de protéine possédant le domaine basique de Tat (PTD1) fusionné à la GFP seule (images de gauche) ou en fusion à SUMO-1 (images milieu gauche) ou en fusion avec l'ubiquitine (images milieu droite). Des cellules ont également été incubées avec une protéine contrôle Flag-Ub-GFP (images de droite). Après deux heures de contact, les cellules ont été lavées puis déposées sur une lame recouverte de polylysine afin d'assurer leur adhérence, puis observées par microscopie confocale. Les images ont été prises en transmission (en haut) et en fluorescence (GFP) (en bas).

II. Régulation de la fonction Rev par l'ubiquitine et SUMO

Les modifications post-traductionnelles affectent de manière importante l'activité et le devenir de nombreuses protéines cellulaires et virales. Parmi ces modifications, l'ubiquitylation et la sumoylation deviennent d'un intérêt grandissant, puisque leurs rôles sur les substrats modifiés sont multiples et peuvent affecter les grandes voies cellulaires.

Dans le cas du HIV-1, plusieurs protéines virales utilisent les systèmes ubiquitine et SUMO pour leur propre activité, afin d'optimiser la réplication virale et de contrôler les réponses immunitaires. En particulier, il a été montré que la polyubiquitylation de Tat par Hdm2 ne déstabilise pas la protéine mais stimule son activité transcriptionnelle (Bres et al., 2003). L'effet de telles modifications sur Rev, cette autre protéine régulatrice essentielle au cycle viral, n'a à l'heure actuelle jamais été étudié. Par ailleurs, les résultats obtenus quant au mécanisme d'action du SHPR190 dans l'inhibition de la fonction Rev corroborent l'idée d'une relation entre Rev et l'ubiquitine. C'est pourquoi nous avons regardé si Rev est modifiée par l'ubiquitine ou par SUMO-1 et comment ces modifications peuvent affecter l'activité de la protéine virale.

II.1. Rev et l'ubiquitine

II.1.1. Rev est modifiée par l'ubiquitine

a) Rev est régulée par l'ubiquitine dans les cellules transfectées

L'ubiquitylation d'une protéine résulte en une liaison covalente entre la lysine de la protéine et le résidu glycine carboxy-terminal de l'ubiquitine, puis entre des monomères d'ubiquitine pour former une chaîne fixée sur le substrat. Le poids moléculaire de ce dernier est donc modifié en fonction du nombre de monomères fixés. Ces variations de poids moléculaire sont aisément révélées après migration et immunoempreinte réalisée avec un anticorps dirigé contre l'ubiquitine ou toute autre partie du substrat, et on observe des échelles ou trainées correspondant aux différentes formes conjuguées de la protéine.

Selon ce principe, nous avons transfecté des cellules adhérentes COS7 avec un vecteur d'expression de Rev fusionnée à l'étiquette « 6 Histidine » et avec des quantités croissantes de vecteur permettant l'expression de l'ubiquitine possédant l'épitope HA à son extrémité amino-terminale. Nous avons réalisé des extraits cellulaires dans un tampon contenant des détergents et des inhibiteurs de protéases, afin de limiter la dégradation des protéines. Par immunoempreinte d'aliquots de ces extraits avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope HA, nous observons une trainée correspondant aux protéines polyubiquitylées, qui s'intensifie au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en ubiquitine (Figure 63, panneau du bas). L'immunoempreinte utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Rev indique que la concentration intracellulaire de Rev augmente en parallèle de la quantité d'ubiquitine (Figure 63, panneau du haut). A forte concentration d'ubiquitine, cet effet sur Rev semble atténué (Figure 63, en haut, piste 5). Ces différences de profils ne sont pas dues à des variations dans la quantité d'extraits cellulaires déposés pour l'immunoempreinte, puisque le signal révélé par un anticorps dirigé contre l'actine est homogène (Figure 63, panneau du milieu).

Ces observations suggèrent que la présence d'ubiquitine dans la cellule a un effet plutôt stabilisateur sur Rev, à l'origine de l'augmentation apparente de la forme non modifiée de la protéine. Les formes modifiées ne sont pas visibles par l'immunoempreinte utilisant l'anticorps dirigé contre Rev (non illustré). Ceci est probablement dû au fait que l'hydrolyse des chaînes d'ubiquitine est très active et difficilement contrôlable lors de la préparation des extraits cellulaires, et les formes polyubiquitylées des protéines sont rapidement détruites.

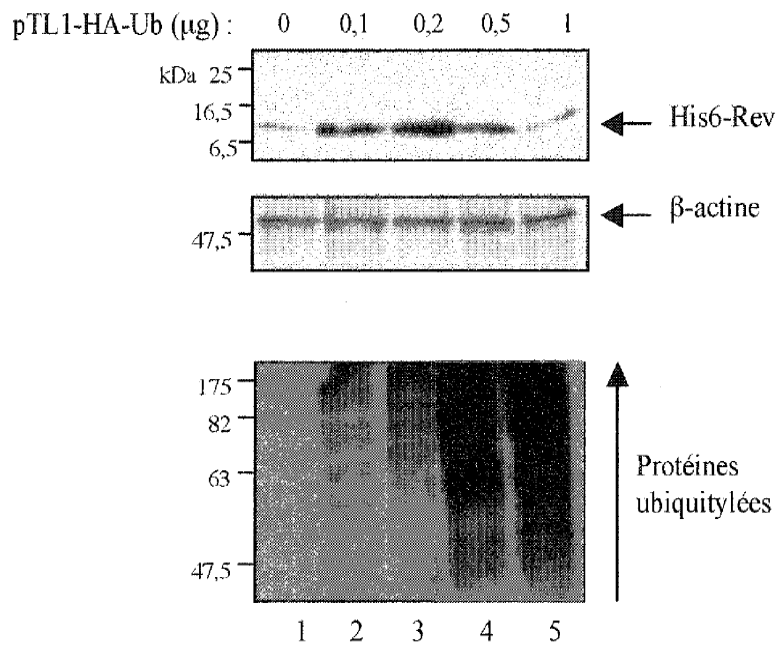


Figure 63 : La concentration intracellulaire en ubiquitine affecte l'abondance de Rev dans les cellules.

Les cellules COS7 ont été transfectées avec 2 µg de plasmide exprimant la protéine Rev sauvage étiquetée avec le motif 6 Histidine (His6-Rev), en absence (piste 1) ou en présence de 100 ng, 200 ng, 500 ng ou 1 µg de plasmide exprimant l'ubiquitine étiquetée du motif HA (HA-Ub) (pistes 2 à 5). 42 heures après transfection, des quantités égales d'extraits cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE. Les immunoempreintes ont été réalisées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneau du haut), avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la β-actine (panneau du milieu), ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre le motif HA (panneau du bas).

b) Des chaînes d'ubiquitine se fixent sur Rev

Nous avons ensuite regardé si les observations précédentes correspondent à une fixation directe de l'ubiquitine sur Rev. Nous avons réalisé des extraits de cellules adhérentes 293T contenant l'ubiquitine étiquetée par l'épitope HA et la protéine Rev étiquetée par le motif Flag, avec un tampon contenant de l'iodoacétamide, un inhibiteur puissant des hydrolases, et des inhibiteurs de protéases, afin de limiter au maximum la déubiquitylation. A partir de ces extraits, nous avons réalisé une immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre le

motif Flag, afin d'enrichir les extraits en protéines Rev. Ceux-ci ont été analysés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le motif HA (Figure 64 (A), panneau du haut) ou contre Flag (Figure 64 (A), panneau du bas). Nous observons ainsi l'apparition d'une trainée correspondant très probablement aux formes polyubiquitylées de Rev lorsque l'ubiquitine est présente (Figure 64 (A), en haut, pistes 2 à 4).

Cependant, les lysats cellulaires bruts contiennent également des protéines pouvant interagir avec la protéine Rev, et qui peuvent elles-mêmes être ubiquitylées. Ces protéines pourraient être à l'origine du profil de migration observé dans les hauts poids moléculaires, et biaiser l'interprétation des résultats. Par ailleurs, l'immunoempreinte utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre Flag détecte la forme non conjuguée de Rev, dont la concentration augmente sensiblement en présence d'ubiquitine (Figure 64 (A), en bas, comparer pistes 1 et 2), mais elle ne permet pas de détecter les formes de plus hauts poids moléculaires de Rev (non illustré). La technique d'immunoprécipitation est peut-être trop peu sensible pour visualiser clairement les formes polyubiquitylées de la protéine. Cette absence de détection peut également s'expliquer par la présence d'un seul épitope Flag contre plusieurs épitopes HA sur la protéine Flag-Rev polyubiquitylée. Ainsi, il semble plus aisé de détecter la chaîne de polyubiquitine plutôt que la protéine Rev, en utilisant l'anticorps dirigé contre le motif HA qui reconnaîtra plusieurs épitopes.

Dans ces expériences, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, sur la quantité intracellulaire de Rev en présence d'ubiquitine. Cet inhibiteur entraîne l'arrêt du processus de dégradation des protéines polyubiquitylées, qui s'accumulent alors dans la cellule. De manière surprenante, il n'en est pas le cas pour les formes polyubiquitylées de Rev, dont le niveau global n'est pas ou peu affecté par un traitement au MG132 (Figure 64 (A), en haut, comparer les pistes 2 et 4). Dans ces conditions, la quantité des formes non modifiées de Rev n'est pas augmentée. Ainsi, le MG132 ne stabilise ni la forme non-conjuguée ni les formes modifiées de Rev. Celle-ci, bien que polyubiquitylée, n'est donc probablement pas envoyée vers la dégradation par le protéasome, mais cette modification augmente sa concentration intracellulaire.

(A)

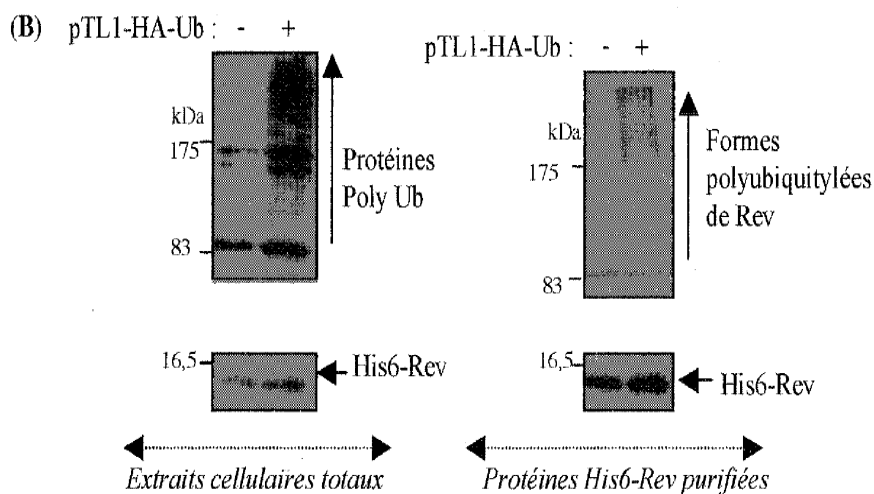
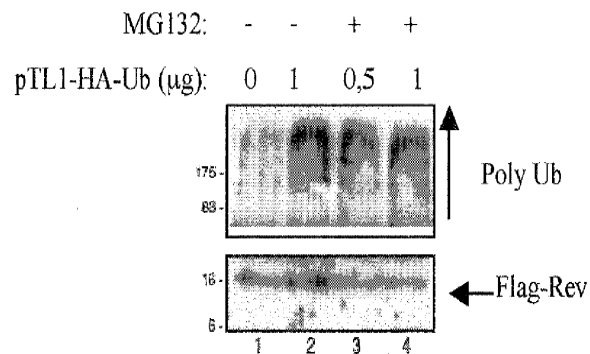


Figure 64 : La protéine Rev est modifiée par addition de chaînes de polyubiquitine.

- (A) Les cellules 293T ont été transfectées avec 4 µg de plasmide exprimant la protéine Rev étiquetée par l'épitope Flag (Flag-Rev), en l'absence (piste 1) ou en présence de 0,5 µg (piste 3) ou 1 µg (pistes 2 et 4) de plasmide exprimant HA-ubiquitine. Pour les pistes 3 et 4, 20 µM de MG132 a été ajouté 5 heures avant récupération des cellules. 42 heures après transfection, les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 10 mM d'iodoacétamide, un inhibiteur puissant des hydrolases cellulaires. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités par un anticorps monoclonal dirigé contre le motif Flag, et les immunoempreintes ont été réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le motif HA (panneau du haut), ou à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre le motif Flag (panneau du bas).
- (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec 4 µg de plasmide exprimant la protéine Rev sauvage fusionnée au motif 6His, en l'absence (-) ou en présence (+) de 0,4 µg de plasmide exprimant HA-ubiquitine. 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été purifiés sur résine de Nickel. Des quantités égales d'extraits cellulaires avant (à gauche) et après purification (à droite) ont été analysées par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (en bas) ou à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope HA (en haut).

Nous avons utilisé une autre approche afin de confirmer si les produits de haut poids moléculaires détectés en purifiant la protéine Rev en présence d'ubiquitine correspondent bien à des formes polyubiquitylées de Rev. Celle-ci fait appel à une purification de la protéine Rev fusionnée à l'étiquette « six histidines », sur une résine de Nickel et dans des conditions hautement dénaturantes. Ces conditions extrêmement stringentes (guanidine et urée) permettent de s'affranchir de la présence de produits pouvant être ubiquitylés et interagissant avec Rev, pour ne conserver que les modifications covalentes de la protéine virale. Ces conditions empêchent également l'action des protéases et des déubiquitylases cellulaires, et permettent de conserver les formes polyubiquitylées souvent très fragilisées par les manipulations expérimentales.

Les immunoempreintes d'extraits purifiés ont été réalisées à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Rev, pour détecter les formes non conjuguées de la protéine. Les produits de haut poids moléculaires, correspondant aux formes polyubiquitylées de Rev, ont été détectés à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope HA. Ainsi, dans des cellules 293T transfectées avec les plasmides exprimant Rev et l'ubiquitine, nous observons une trainée correspondant à des produits de haut poids moléculaires (Figure 64 (B), panneau de gauche), dont une partie est également détectée après purification des protéines Rev sur résine de Nickel (Figure 64 (B), panneau de droite). Ces observations confirment que Rev est modifiée par modification covalente avec l'ubiquitine dans des cellules transfectées. Par ailleurs, les profils de migration sont détectés uniquement dans les hauts poids moléculaires, et nous n'observons pas de signal correspondant à des formes mono ou di-ubiquitylées de Rev (Figure 64 (B), panneau de droite). Celle-ci semble donc être modifiée par l'ajout d'une longue chaîne de polyubiquitine.

II.1.2. Cartographie de la Lysine de Rev permettant la liaison de l'ubiquitine

a) Mutation des lysines de Rev

L'ubiquitine se lie de manière covalente sur un résidu lysine (K) de la protéine à modifier. La séquence Rev utilisée dans l'ensemble des expériences (souche HIV-LAI) contient trois lysines sur les positions 14, 20 et 115. Afin de caractériser de manière fine le ou les résidus ciblés par l'ubiquitine, nous avons réalisé un ensemble de mutants comprenant une ou

plusieurs substitutions lysine en arginine, parmi toutes les combinaisons possibles entre les trois résidus lysines de Rev. Ces mutants, comme la protéine Rev sauvage, ont été fusionnés à leur extrémité amino-terminale avec le motif de « six histidines » pour permettre leur purification par affinité sur une résine de Nickel (Figure 65 (A)).

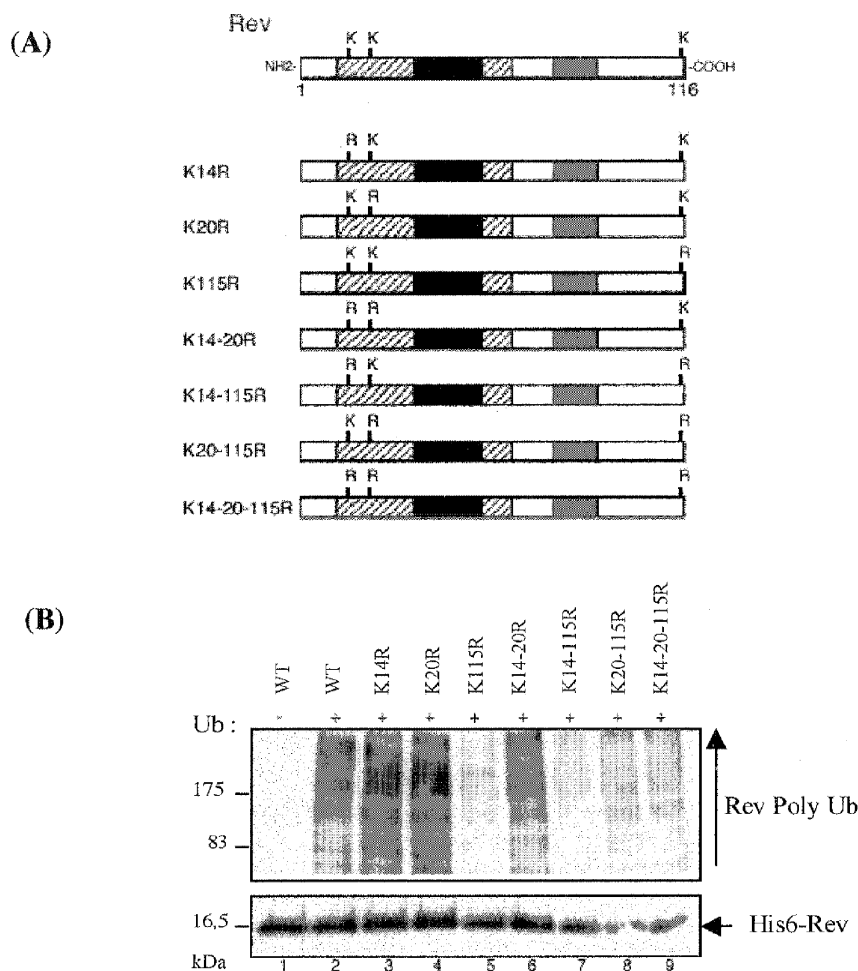


Figure 65 : La lysine 115 de Rev est la cible de l'ubiquitylation.

- A) Représentation schématique des mutants de Rev, dans lesquels un ou plusieurs résidu(s) lysine sur les positions 14, 20 ou 115 de la séquence Rev ont été substitués par un résidu arginine. Ces mutants ont été créés par mutagenèse dirigée à partir du vecteur pSG-His6Rev sauvage et possèdent donc le motif His6 pour permettre leur purification sur résine de Nickel (non illustré).
- B) Les cellules 293T ont été transfectées avec 2 μ g de plasmide exprimant l'une des protéines Rev étiquetées par le motif 6His : la protéine Rev sauvage (pistes 1 et 2) ou un mutant de Rev (pistes 3 à 9), en absence (piste 1) ou en présence de 0,2 μ g pSG-HA-Ub (pistes 2 à 9). 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été purifiés sur résine de Nickel. Les immunoempreintes ont été réalisées à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Rev (panneau du bas) ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre le motif HA (panneau du haut).

b) La lysine 115 de Rev est le site de branchement de l'ubiquitine

Chaque mutant de Rev a été exprimé en présence d'ubiquitine (HA-Ubiquitine), afin d'étudier leur profil d'ubiquitylation. Les extraits cellulaires ont été réalisés dans des conditions hautement dénaturantes, puis les formes de Rev ont été purifiées sur une résine de Nickel dans des conditions similaires. Ces conditions permettent de s'affranchir de la récupération d'autres protéines ubiquitylées que Rev, qui seule est retenue sur la résine. Les formes polyubiquitylées de Rev ont été analysées par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps dirigé contre le motif HA (Figure 65 (B), panneau du haut). Les formes non modifiées de Rev ont été révélées par immunoempreinte utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev, afin de vérifier l'homogénéité de production et de purification de Rev entre les différents cas (Figure 65 (B), panneau du bas). L'analyse des fractions éluées de la résine montre une trainée correspondant aux formes polyubiquitylées de Rev lorsque l'ubiquitine est présente (Figure 65 (B), pistes 1 et 2). La mutation individuelle des lysines 14 ou 20 n'affecte pas l'intensité du signal, et les deux mutants présentent le même profil de migration que la protéine Rev sauvage (Figure 65 (B), comparer pistes 2, 3 et 4). A l'inverse, la mutation de la lysine 115 réduit de manière considérable l'intensité du signal, ce qui indique que ce mutant de Rev n'est pas ou très peu modifié par l'ubiquitine (Figure 65 (B), piste 5). La double mutation des lysines 14 et 20 n'a pas d'impact sur le profil d'ubiquitylation (Figure 65 (B), piste 6), alors que la mutation de la lysine 115, combinée avec celle de la lysine 14 ou 20 ou des deux, réduit de nouveau l'apparition de formes modifiées de Rev (Figure 65 (B), pistes 7 à 9). Ces observations confirment que Rev est effectivement polyubiquitylée, et établissent que la lysine 115 est le site de fixation de l'ubiquitine.

II.1.3. Cartographie des lysines de l'ubiquitine impliquées dans sa fixation sur Rev

L'ubiquitine contient 7 résidus lysine en positions 7, 11, 27, 29, 33, 48 et 63, tous potentiellement capables d'effectuer une liaison covalente avec un substrat. Par ailleurs, la nature du branchement entre les monomères d'ubiquitine détermine le devenir du substrat modifié dans la cellule. Ainsi, connaître la nature du branchement des chaînes d'ubiquitine sur Rev permettra d'appréhender leur rôle sur l'activité de la protéine virale. Afin de définir le ou les résidus de l'ubiquitine impliqués dans sa fixation sur Rev, des mutants de l'ubiquitine sur chacune des 7 lysines ont été créés.

Chaque mutant possède une unique lysine fonctionnelle, les autres étant substituées par un résidu arginine, et est fusionné l'étiquette HA (Figure 66 (A)). Le mutant HAUb-K0, dans lequel toutes les lysines sont mutées en arginine, est utilisé comme contrôle négatif.

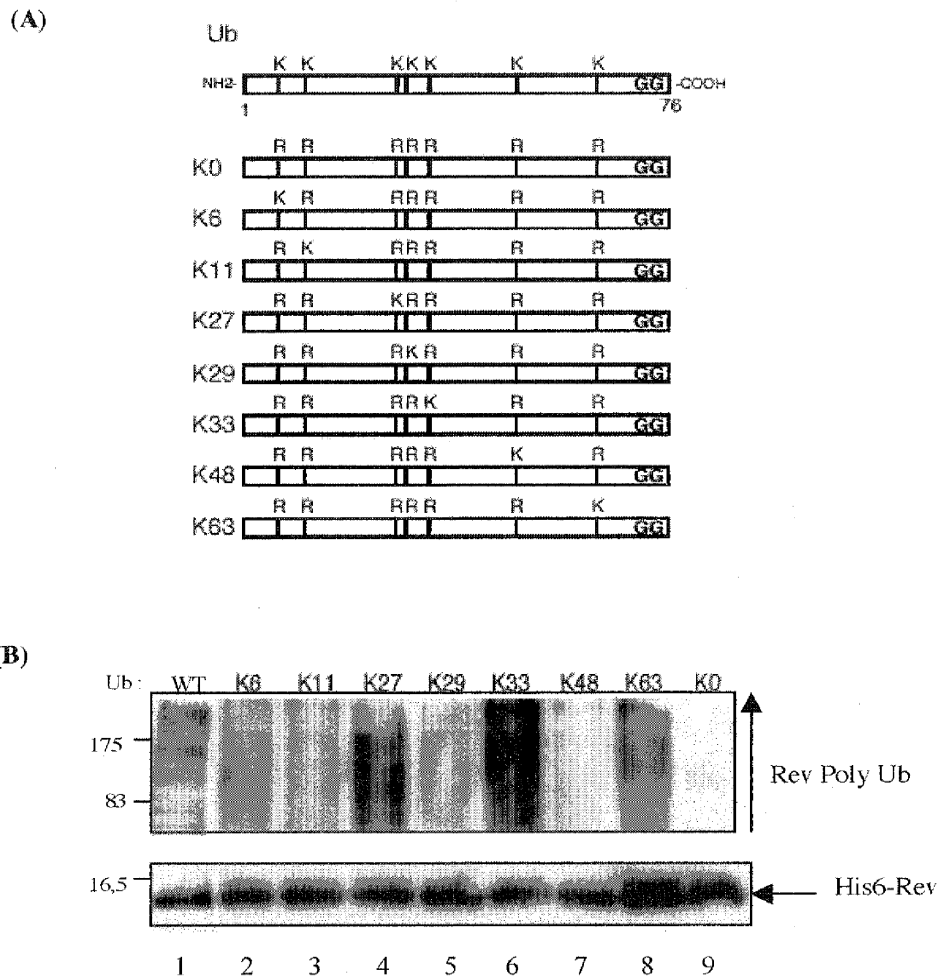


Figure 66 : Le branchement des chaînes d'ubiquitine fixées sur Rev s'effectue principalement via la lysine 33.

- (A) Représentation schématique des mutants de l'ubiquitine, dans lesquels un seul résidu lysine parmi les sept présents dans la séquence est conservé, les autres étant remplacés par un résidu arginine. Le mutant K0 contient 7 résidus arginine à la place des lysines. Ces mutants ont été obtenus à partir de la séquence codant pour l'ubiquitine, sauvage ou mutée sur K48 ou K63, étiquetée par le motif HA. Ils ont été sous clonés dans un vecteur pTL1, pour donner des plasmides pTL1-HA-Ub.
- (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec 2 µg de plasmide exprimant la protéine His6-Rev sauvage et 0,2 µg des plasmides exprimant l'ubiquitine sauvage (piste 1) ou mutée sur la lysine 6, 11, 27, 29, 33, 48, ou 63 (pistes 2 à 8) ou mutée sur les sept lysines (piste 9). 42 heures après transfection, les extraits ont été purifiés sur résine de Nickel. Les immunoempreintes ont été réalisées à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneau du bas) ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre le motif HA (panneau du haut).

Nous avons purifié des extraits de cellules 293T exprimant la protéine Rev sauvage étiquetée avec le motif « six Histidine » et les différents variants de l'ubiquitine, sur résine de Nickel en conditions hautement dénaturantes. Les formes polyubiquitylées de Rev ont été analysées par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps dirigé contre le motif HA (Figure 66 (B), panneau du haut), et les produits non conjugués ont été révélés par immunoempreinte utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (Figure 66 (B), panneau du bas). En présence du mutant HAUb-K0 aucun signal correspondant à des formes de Rev de haut poids moléculaire n'est détecté (Figure 66 (B), en haut, piste 9). Ceci vérifie que le signal détecté est bien spécifique des formes ubiquitylées de Rev, et permet de comparer les profils de migration obtenus avec les autres mutants.

Ainsi, le mutant HAUb-K33, dont seule la lysine 33 est fonctionnelle, semble modifier Rev efficacement, puisque la trainée correspondant aux formes polyubiquitylées de Rev est d'une très forte intensité (Figure 66 (B), piste 6). Une trainée est également bien visible avec le mutant HAUb-K27, mais les formes de très haut poids moléculaire ne sont pas détectées (Figure 66 (B), piste 4). Le mutant HAUb-K63 semble également capable de polyubiquityler Rev, mais de manière beaucoup moins efficace que HAUb-K33, d'autant plus que la quantité de Rev non conjuguée retenue sur la résine est plus forte dans ce cas (Figure 66 (B), piste 8, panneaux du haut et du bas). De manière intéressante, le profil de migration avec le mutant HAUb-K48 se rapproche de celui obtenu avec le mutant non fonctionnel HAUb-K0, ce qui indique que l'ubiquitylation de Rev ne s'effectue pas via la lysine 48 de l'ubiquitine (Figure 66 (B), piste 7). D'une manière similaire, les autres mutants HAUb-K6, HAUb-K11 et HAUb-K29 ne semblent pas capables de se fixer sur Rev : le branchement de l'ubiquitine sur Rev n'implique pas l'une de ces trois lysines (Figure 66 (B), pistes 2, 3 et 5).

Ces observations indiquent que le branchement de l'ubiquitine sur Rev s'effectue principalement via la lysine 33, et d'une manière plus discrète via les lysines 27 et 63.

II.1.4. L'ubiquitylation de Rev n'affecte pas sa localisation intracellulaire mais module son activité

Afin de déterminer le rôle de la polyubiquitylation sur l'activité de Rev, nous avons analysé la concentration intracellulaire de la protéine Rev sauvage et des différents mutants, dans un

contexte cellulaire normal (sans ubiquitine exogène). Les extraits cellulaires ont été réalisés dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases et révélés par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps dirigé contre Rev. L'immunoempreinte réalisée par un anticorps dirigé contre l'actine montre une légère hétérogénéité des différents dépôts, prise en compte pour l'interprétation des résultats (Figure 67 (A), panneau du bas). Nous observons ainsi que la mutation de la lysine 115, seule ou en combinaison avec la substitution des autres lysines, réduit de manière considérable la concentration intracellulaire de Rev (Figure 67(A), en haut, comparer les pistes 1, 2, 3 et 5 avec les pistes 4, 6, 7 et 8). Ces résultats sont en accord avec les précédents, qui montrent une augmentation de la quantité de Rev lorsque sa polyubiquitylation est stimulée par la surexpression de l'ubiquitine dans les cellules (cf. Figure 63 et 64 (A)). Ainsi, la mutation de la lysine 115, en bloquant une polyubiquitylation efficace, réduit l'abondance intracellulaire de Rev.

Ayant établi cette première conclusion, nous nous sommes demandé si la mutation de la lysine 115 de Rev pouvait affecter sa localisation dans la cellule. Nous avons donc séparé les différents compartiments cellulaires par un fractionnement à partir d'extraits de cellules surexprimant la protéine His6-Rev sauvage ou mutée sur la lysine 115. L'analyse par immunoempreinte d'un aliquot de chacune des fractions recueillies à l'aide de l'anticorps dirigé contre Rev montre la répartition intracellulaire de la protéine (Figure 67 (B), panneau du haut). En accord avec les résultats obtenus à partir d'extraits cellulaires totaux, nous observons une diminution de la quantité du mutant RevK115R dans chacune des trois fractions cellulaires collectées (Figure 67 (B), pistes 4, 5 et 6). Par ailleurs, il apparaît que la concentration en protéines RevK115R est particulièrement réduite dans la fraction cytoplasmique (Figure 67 (B), comparer les pistes 1 et 4). L'immunoempreinte à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la Ribonucléotide Réductase (*RRM2*) permet de contrôler la bonne qualité du fractionnement (Figure 67 (B), panneau du bas).

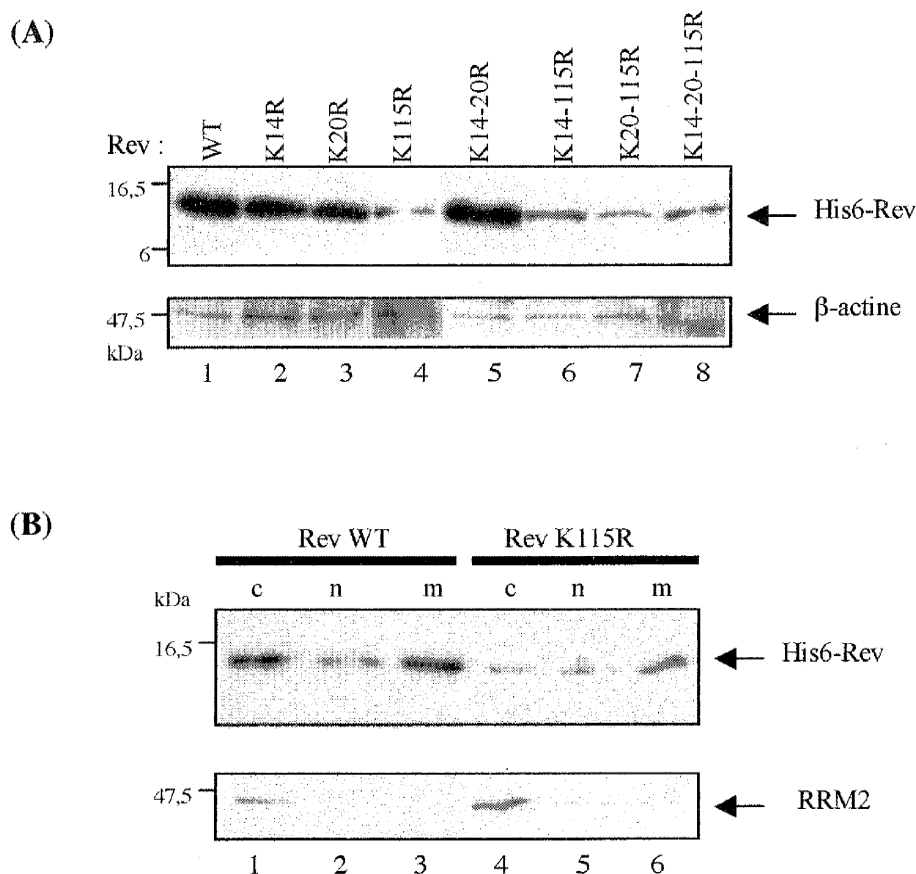


Figure 67 : La mutation de la lysine 115 de Rev affecte sa stabilité et sa localisation intracellulaire.

- (A) Les cellules 293T ont été transfectées avec 2 μ g de plasmide exprimant His6-Rev sauvage (piste 1) ou mutée (pistes 2 à 9). 42 heures après transfection, les cellules ont été lysées, puis des quantités égales d'extraits ont été séparées par SDS-PAGE. Les immunoempreintes ont été réalisées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneau du haut) ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la β -actine (panneau du bas).
- (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec 2 μ g de plasmide exprimant la protéine His6-Rev sauvage (pistes 1 à 3) ou mutée sur la lysine 115 (pistes 4 à 6). 42 heures après transfection, les extraits cellulaires ont été fractionnés pour séparer les phases nucléaire (n), cytoplasmique (c) et membranaire (m). L'immunoempreinte a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev (panneau du haut) ou avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la ribonucléotide réductase (RRM2) (panneau du bas).

Ces observations suggèrent que le mutant RevK115R est déstabilisé dans le cytoplasme ou qu'il est importé au noyau de manière plus efficace que la protéine Rev sauvage.

Nous avons ensuite regardé si la mutation de la lysine 115 pouvait affecter l'activité de la protéine Rev dans la cellule. Cette question a été examinée avec le plasmide rapporteur pDM128, dans des conditions où l'activité de Rev varie de manière linéaire en fonction de sa

concentration intracellulaire (Figure 68 (A)). Les données indiquées dans la Figure 68 (B) sont le résultat de trois expériences indépendantes et identiques, ce qui permet d'apporter des réponses significatives quant à l'effet d'une mutation de séquence sur la fonction Rev. Le graphe représente ainsi la moyenne des trois valeurs obtenues, et les barres d'erreur indiquent la déviation standard. Compte tenu de ces éléments, nous pouvons conclure que la mutation simultanée des lysines 14 et 20 de Rev n'affecte pas de manière significative l'activité de la protéine virale (Figure 68 (B), rectangle du milieu). Au contraire, l'expression du mutant RevK115R se traduit par une augmentation évidente de la production de l'enzyme CAT (Figure 68 (B), rectangle de droite), alors que celui-ci est moins abondant dans les cellules que la protéine Rev sauvage (Figure 68 (C), pistes de droite). Ainsi, d'une manière surprenante, l'absence d'ubiquitylation de Rev provoque sa déstabilisation dans la cellule mais ne réduit pas son activité. Ces observations suggèrent que l'ubiquitylation de la lysine 115 de Rev ne régule pas de manière directe son activité d'export, mais stabilise la protéine dans la cellule.

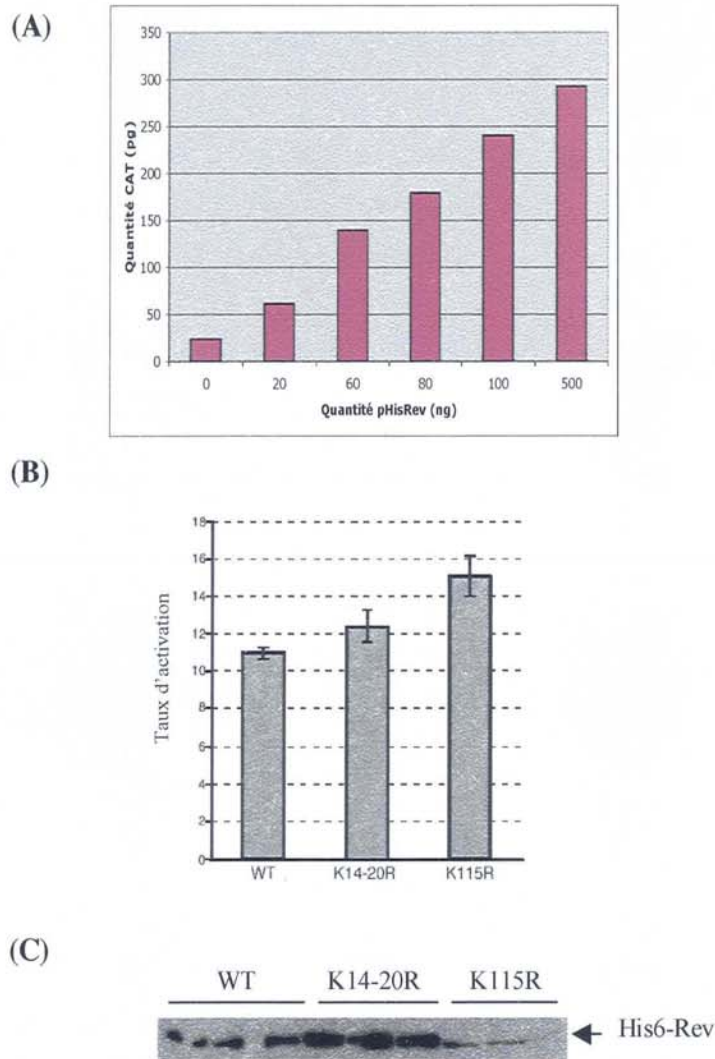


Figure 68 : La mutation de la lysine 115 de Rev augmente l'activité de la protéine.

- (A) Les cellules 293T ont été co-transfectées avec 200 ng de vecteur pDM128 seul ou en présence de différentes quantités de plasmide exprimant la protéine His6-Rev sauvage (20, 60, 80, 100 et 500 ng). 42 heures après transfection, des quantités égales d'extraits cellulaires ont été analysées pour leur concentration en enzyme CAT par test ELISA. Les quantités d'enzyme obtenues (en picogrammes) sont indiquées sur le graphe.
- (B) Les cellules 293T ont été co-transfectées avec 200 ng de pDM128 et 200 ng de plasmide exprimant la protéine His6-Rev sauvage (WT) ou mutée sur les lysines 14 et 20 (K14-20R) ou mutée sur la lysine 115 (K115R). 42 heures après transfection, des quantités égales d'extraits cellulaires ont été analysées par test ELISA. Les résultats sont indiqués comme taux d'activation de l'expression de CAT par rapport à la valeur obtenue avec le plasmide pDM128 seul. Les rectangles représentent la valeur moyenne obtenue à partir de trois points de transfection identiques et indépendants. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard.
- (C) Pour chaque point testé par ELISA, des quantités égales d'extraits cellulaires ont été analysées par immunoprinte à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre Rev.

II.2. Rev et SUMO-1

La sumoylation est une autre modification post-traductionnelle qui, à l'image de l'ubiquitylation, module de manière réversible l'activité ou la localisation de nombreuses protéines cellulaires et virales. Par ailleurs, plusieurs cas de compétition entre l'ubiquitylation et la sumoylation pour un même substrat sont répertoriés. Nous avons donc étudié la relation entre Rev et SUMO-1, afin de déterminer si cette protéine régule l'activité de Rev, en parallèle ou en compétition avec l'ubiquitine.

II.2.1. Rev n'est pas régulée par SUMO-1

Afin de déterminer si la présence de SUMO-1 dans la cellule peut moduler l'activité de Rev, nous avons co-transfecté des cellules 293T avec le vecteur d'expression de Rev étiquetée du motif « 6 Histidine » et avec des concentrations croissantes de plasmide codant pour la protéine SUMO-1. Des extraits cellulaires ont été réalisés dans un tampon contenant des détergents et des inhibiteurs de protéases, puis des quantités égales ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre Rev (Figure 69 (A)). Le signal obtenu est homogène dans tous les cas, ce qui indique que la présence de SUMO-1, même en large excès dans les cellules, n'affecte pas l'abondance intracellulaire de Rev.

II.2.2. Rev n'est pas modifiée par SUMO-1

Nous avons ensuite vérifié si SUMO-1 est capable de se fixer sur Rev, par des expériences d'immunoprécipitation similaires à celles effectuées avec l'ubiquitine. Des extraits cellulaires contenant la protéine Rev étiquetée du motif Flag et la protéine SUMO-1 ont été réalisés dans les mêmes conditions (présence d'inhibiteurs puissants de protéases et d'hydrolases), puis les protéines Rev ont été purifiées à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Flag (Figure 69 (B), panneau du bas), ou contre SUMO-1 (Figure 69 (B), panneau du haut). Dans les fractions purifiées, nous ne détectons pas de protéine Rev modifiées, et seule la bande correspondant à la forme non conjuguée de Rev est présente (Figure 69 (B), en bas, pistes 1, 2 et 3). Même après ajout de l'inhibiteur du protéasome MG132, pour maintenir intactes les protéines sumoylées, aucun produit modifié de Rev n'est observé (Figure 69 (B), pistes 4 et 5). Rev ne semble donc pas être un substrat pour la modification par SUMO-1.

Pour confirmer ces résultats, nous avons co-transfecté des cellules 293T avec le plasmide codant pour SUMO-1 et un plasmide d'expression de His6-Rev sauvage ou mutée sur les trois lysines. Nous avons purifié les extraits sur une résine de Nickel en conditions dénaturantes, afin d'éliminer toute contamination éventuelle et d'inhiber efficacement les désumoylases. Les fractions ainsi purifiées ont été analysées par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre Rev (Figure 69 (C), panneau du bas) ou d'un anticorps monoclonal dirigé contre SUMO-1 (Figure 69 (C), panneau du haut). Dans aucun des cas nous ne détectons de bandes spécifiques correspondant à des formes de Rev de poids moléculaire en présence de SUMO-1 (Figure 69 (C), pistes 1 et 2). Ainsi, dans ces conditions expérimentales, Rev n'est pas modifiée par la protéine SUMO-1.



II.3. Conclusions

L'ensemble des observations indique que Rev est un substrat pour l'ubiquitine, mais qu'elle n'est pas modifiée par SUMO. Cette dernière n'affecte donc pas la fonction de Rev, et n'intervient pas en compétition avec l'ubiquitine pour contrôler la protéine virale.

Par ailleurs, l'ubiquitylation de Rev s'effectue au niveau de son résidu pénultième, la lysine 115.

L'ubiquitine forme très probablement des chaînes de polyubiquitine sur Rev, principalement via son résidu lysine en position 33. Il apparaît également que les formes polyubiquitylées donnent un profil de migration détecté uniquement dans les très hauts poids moléculaires, indiquant la formation de longues chaînes d'ubiquitine sur Rev et l'absence de formes conjuguées à un ou quelques monomères d'ubiquitine.

La perte d'ubiquitylation de Rev, par la mutation de la lysine 115 en arginine, entraîne une diminution drastique de son abondance dans la cellule, sans toutefois affecter l'activité de la protéine virale. Il apparaît ainsi que la polyubiquitylation de Rev a uniquement un rôle stabilisateur sur la protéine virale, qui est alors plus abondante dans la cellule, mais probablement au détriment de son activité.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Préambule

En préambule de cette discussion, il est important d'expliquer notre intérêt pour la protéine virale Rev, et pourquoi il nous semble intéressant d'inhiber sa fonction pour tenter d'enrayer la réplication virale.

Comme nous l'avons vu dans la partie « Introduction » de ce manuscrit, le cycle de réplication du HIV-1 se déroule en deux phases distinctes, dont la transition dépend intimement du niveau de protéines Rev présentes dans la cellule. En effet, au début du cycle de réplication, la quantité de Rev est faible, et les ARNm viraux non ou partiellement épissés ne sont pas ou peu exportés au cytoplasme. Dans ce cas, seules les protéines précoces, issues des ARNm viraux multi-épissés, sont exprimées, et en particulier Tat et Rev. Cette dernière s'accumule alors dans la cellule, jusqu'à une concentration limite qui déclenchera la phase tardive du virus en permettant l'export des ARNm non complètement épissés.

Par ailleurs, une relation entre Rev et la faible réplication du HIV-1 dans les astrocytes du système nerveux central a été montrée (Fang et al., 2002). En effet, il existe dans ces cellules une forme mutée et inactive de Rev, qui semble responsable du défaut de réplication du virus et expliquerait la faible infectivité des astrocytes.

Il semble donc envisageable d'empêcher l'expression des protéines tardives du virus en maintenant la concentration intracellulaire de Rev en dessous d'un seuil limite, en deçà duquel Rev ne peut pas permettre l'achèvement du cycle viral.

Par ailleurs, en maintenant le virus dans sa phase précoce, les protéines issues des ARNm viraux multi-épissés s'accumuleront dans la cellule, et en particulier la protéine Tat. L'organisme hôte déclenchera alors des réponses immunitaires contre l'infection virale, notamment par la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre Tat.

Ainsi, en limitant l'action de Rev, il semble possible à la fois d'empêcher la production de particules virales infectieuses et de stimuler les défenses immunitaires de l'organisme hôte.

I. Bilan de l'étude des propriétés inhibitrices des SHPR

I.1. Mécanisme d'action des SHPR

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence le mécanisme d'action principal de peptides inhibiteurs dirigés contre Rev préalablement identifiés dans le laboratoire. Nous avons en effet montré que ces molécules, bien qu'initialement désignées pour interagir avec la séquence NES de Rev, n'empêchent pas la fixation d'un de ses partenaires cellulaires, le facteur d'export hCRM1, au niveau de cette séquence. Par ailleurs, l'interaction de Rev avec son élément de réponse sur l'ARN, le RRE, n'est aucunement affectée par la présence des SHPR dans le noyau, et Rev continue à prendre en charge les messagers viraux pour les exporter au cytoplasme. Les observations en microscopie ont indiqué que la répartition de la protéine virale à l'intérieur des cellules n'est pas modifiée par les SHPR, mais nous avons constaté de manière récurrente que l'abondance de Rev diminue dans les cellules exprimant ces molécules. Il apparaît donc que les SHPR inhibiteurs, et en particulier le SHPR190, provoquent une déstabilisation de la protéine virale dans les cellules, dont la concentration intracellulaire est significativement réduite. Cette baisse de quantité de Rev explique la diminution globale d'activité que nous avons observée dans les différents tests utilisés.

L'ensemble de ces expériences été réalisé par transfection transitoire, afin d'accroître la quantité de protéines Rev et de SHP dans les cellules. En effet, les conditions de transfection utilisées permettent d'obtenir un niveau suffisant de chaque protéine, afin de visualiser la protéine virale et d'étudier son comportement en présence des inhibiteurs.

Bien que les SHPR soient actifs à partir du milieu extracellulaire, nous n'avons pas réitéré les expériences avec les protéines SHPR recombinantes. Il serait bien évidemment nécessaire d'étudier le mécanisme d'action des SHPR en apportant les protéines recombinantes dans le milieu de culture.

En particulier, nous avons montré que l'abondance de Rev est réduite lorsque le SHPR190 est fortement exprimé. De telles observations deviennent toutefois quasiment impossibles dans des cellules infectées, puisque le niveau de Rev est difficilement détectable.

Par ailleurs, l'efficacité de pénétration des SHPR semble insuffisante pour espérer voir un effet sur la quantité intracellulaire de Rev, si celle-ci est surexprimée dans les cellules.

1.1.1. Dégradation par le protéasome

Nous avons observé que l'inhibition du protéasome par un inhibiteur spécifique permet de rétablir partiellement la concentration intracellulaire de Rev en présence du SHPR190. Ce peptide recrute donc le système de dégradation protéolytique faisant intervenir le protéasome pour déstabiliser la protéine virale.

Par ailleurs, nous avons observé à plusieurs reprises que les SHPR s'accumulent dans le noyau des cellules transfectées et qu'ils sont capables d'atteindre efficacement ce compartiment à partir du milieu extracellulaire.

Le lieu d'action principal des SHPR, si ce n'est exclusif, est donc le compartiment nucléaire, et ceux-ci dirigent les protéines Rev vers les complexes protéasome présents dans le noyau (**Figure 70**).

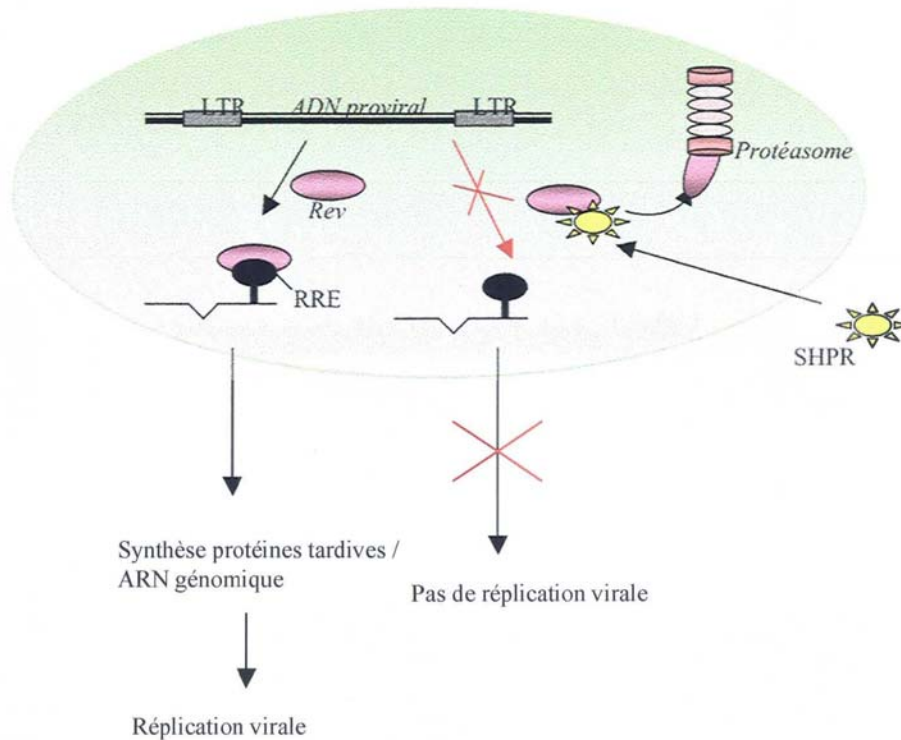


Figure 70 : Les SHPR pénètrent dans le noyau et entraînent la protéine Rev vers le protéasome.

Représentation schématique du modèle proposé pour l'inhibition de la fonction Rev par les SHPR : Les SHPR dirigent la protéine Rev présente dans le noyau vers les complexes du protéasome, probablement avant qu'elle ne reconnaisse les ARNm viraux. Ces derniers ne sont donc plus exportés au cytoplasme, et la traduction des protéines tardives du virus n'aura pas lieu.

De plus, les expériences de retard de gel indiquent que la formation des complexes Rev/RRE n'est pas affectée par les SHPR en terme qualitatif et que les peptides ne se fixent pas sur ces complexes. L'action des SHPR dans le noyau intervient donc très probablement avant que Rev ne recrute les messagers viraux.

Le protéasome est un complexe qui reconnaît les substrats polyubiquitylés et provoque leur dégradation par clivage de la chaîne d'ubiquitine et du substrat lui-même. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence de formes polyubiquitylées de Rev en présence de SHPR190 par des tests d'immunoprécipitation de la protéine en présence du SHP et d'ubiquitine, et ce même en bloquant la voie protéolytique du protéasome. Nous aurions pu réitérer les expériences de purifications sur résine de Nickel, qui semblent plus sensibles et plus

spécifiques que l'immunoprécipitation, afin d'établir clairement si les SHPR provoquent la modification de Rev par l'ubiquitine.

Par ailleurs, nous avons remarqué que le rétablissement de l'abondance de Rev dans les cellules n'est que partiel lorsque le protéasome est inactif. Il est donc probable qu'un autre système cellulaire intervienne pour déstabiliser la protéine virale.

En effet, une autre grande voie dégradative est l'autophagie, qui aboutit à la dégradation des protéines dans les lysosomes. Cette voie est utilisée pour dégrader des complexes protéiques, des agrégats ou des oligomères, comme il en est le cas pour les agrégats de protéines Huntingtine mutantes (Ravikumar and Rubinsztein, 2006). Stimuler cette voie dégradative apparaît d'ailleurs comme une voie thérapeutique attractive pour la maladie de Huntington ou des maladies similaires. Il aurait ainsi été intéressant d'étudier la participation des lysosomes dans la déstabilisation de Rev par le SHPR190, en utilisant des inhibiteurs chimiques spécifiques de cette voie dégradative, ou en la stimulant à l'aide d'antibiotiques comme la Rapamycine.

1.1.2. Autres mécanismes d'action?

Nous avons montré que l'interaction entre Rev et le facteur d'export hCRM1 n'est pas affectée par la présence du SHPR190. Comme nous l'avons décrit dans la partie « Introduction » de ce manuscrit, ce facteur n'est pas le seul partenaire cellulaire impliqué dans la fonction Rev, et il est possible que la liaison de l'un d'entre eux soit perturbée par le SHPR.

On pourrait également imaginer que le SHPR190 séquestre l'une des protéines participant à la fonction de Rev dans le noyau, comme l'hélicase DDX3 qui effectue normalement la navette entre noyau et cytoplasme, en parallèle des complexes ribonucléoprotéiques liés à Rev.

Par ailleurs, nous avons observé que l'interaction entre Rev et hCRM1 est conservée en présence de SHPR190 uniquement dans des expériences réalisées *in vitro*. Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats *in vivo*, et il est possible que dans un contexte cellulaire adapté,

cette association soit perturbée par le peptide inhibiteur. Un autre scénario envisageable est que les complexes Rev/hCRM1 se forment correctement dans le noyau mais que le SHPR les empêche d'être exportés efficacement au cytoplasme. En effet, selon un scénario où plusieurs protéines Rev multimérisent et sont reconnues par plusieurs molécules de hCRM1, on peut imaginer que le SHPR se fixe sur une ou plusieurs séquences NES de Rev restées libres après fixation de hCRM1. Ceci provoquerait un « déficit en NES » bloquant les processus d'export. Il est également possible que le SHPR se fixe à proximité des sites NES, et modifie ainsi la conformation globale des complexes, empêchant leur reconnaissance par un autre co-facteur de l'export.

1.2. Optimisation des propriétés du SHPR190

1.2.1. Bilan des différentes mutations

La seconde partie de ce travail a permis de définir les régions de la séquence du SHPR190 qui lui sont essentielles pour son activité contre Rev.

a) Le motif Flag peut être exclu de la séquence du SHPR190

Nous avons tout d'abord confirmé que l'épitope Flag peut être éliminé de la séquence SHPR sans affecter sa capacité de pénétration dans les cellules ni son action antivirale. Ce motif n'ayant par ailleurs aucune utilité pratique pour les étapes de purification des protéines, nous l'avons rapidement omis de la séquence.

b) La protéine SUMO-1 mutée sur les deux glycines carboxy-terminales soutient les propriétés du peptide

Les molécules de petites tailles comme les SHP sont généralement trop instables dans les milieux extra- et intracellulaire. Nous avons donc sélectionné une protéine cellulaire d'origine humaine, abondante et ubiquitaire dans les cellules, qui permettrait de stabiliser les SHP. Des auteurs ont exploité les propriétés de deux protéines possédant ces caractéristiques, l'ubiquitine et la protéine SUMO-1, pour stabiliser des protéines (Hondred et al., 1999 ; Melchior, 2000). Après des premiers tests utilisant l'une ou l'autre en fusion avec les peptides inhibiteurs, nous avons choisi la protéine SUMO-1, qui seule permettait d'obtenir une efficacité d'inhibition satisfaisante (Roisin et al., 2004). Par ailleurs, les deux glycines carboxy-terminales de SUMO-1 ont été mutées, afin d'éviter un éventuel clivage par des

hydrolases cellulaires, comme il s'en effectue classiquement lors de la maturation des protéines SUMO ou lors de la désumoylation (Melchior, 2000).

De manière intéressante, nous avons constaté qu'il est impossible d'éliminer la séquence SUMO-1 de la molécule SHP sans abolir presque complètement son action antivirale. Il est probable que la protéine SUMO-1 exerce un soutien dans l'activité inhibitrice du SHPR en imposant à la molécule une conformation particulière, importante pour la reconnaissance de Rev et/ou pour sa stabilité.

De la même manière, nous avons observé que la mutation des deux glycines doit être maintenue dans la séquence finale afin de permettre une internalisation correcte des protéines à partir du milieu extracellulaire. Il semble donc s'exercer un clivage relativement actif au niveau du motif diglycine, éventuellement d'ores et déjà dans le milieu extracellulaire ou uniquement à l'intérieur des cellules, empêchant les formes entières du SHPR d'atteindre leur cible virale.

Un tel clivage aurait du être détecté dans les milieux de culture cellulaire lors des tests effectués avec les SHP. En effet, la forme clivée apparaîtrait comme un signal distinct de la forme entière, puisque son profil de migration serait modifié à cause de sa différence de taille. Nous n'avons pas observé de variation de migration des peptides prélevés dans les surnageants de culture, par rapport à celle du peptide issu de la solution protéique initiale (non illustré). Par ailleurs, les tests de stabilité du SHPR190 dans le milieu de culture montrent également l'absence d'un tel clivage dans les conditions utilisées (cf. Figure 56).

Il semble donc que le clivage du SHPR ait lieu à l'intérieur des cellules. Il est probable que ce clivage provoque l'adressage du SHPR vers les voies de dégradation de la cellule, et réduise ainsi le pool de peptides qui pourra effectivement être actif contre Rev.

Il est également possible que les formes clivées ne soient pas dégradées, mais qu'elles ne soient plus capables de reconnaître leur cible virale. En effet, nos résultats indiquent que l'activité inhibitrice du SHPR190 ne lui est pas uniquement conférée par sa séquence heptapeptidique N°190, mais que certains résidus en amont (domaine GAD) et en aval (PTD) apportent leur contribution. Il est alors probable que le clivage dans le PTD endommage les propriétés inhibitrices du SHPR190 dans la cellule.

Il aurait été possible de déterminer plus finement où et quand a lieu ce clivage dans les cellules, par des expériences de vidéo en temps réel de cellules incubées avec le SHPR190

groupé à un fluorochrome dans sa partie amino-terminale. De cette manière, nous aurions pu étudier le comportement du peptide ne possédant pas la mutation GG/AR, en observant la fluorescence émise dans les cellules.

c) Les mutations de la cystéine en position 4 (C132) dans l'heptapeptide et de la cystéine de SUMO-1 peuvent permettre de renforcer l'activité du SHPR190

Bien que la séquence heptapeptidique 190 ait été montrée comme la plus efficace contre l'activité de Rev dans des tests fonctionnels en cellules de mammifères (Roisin et al., 2004), nous avons voulu savoir s'il est possible d'améliorer encore son affinité pour Rev.

L'ensemble des observations suggère qu'il n'est pas possible d'optimiser réellement l'efficacité du SHPR190 dans son action contre Rev en modifiant l'un des résidus de la séquence 190. Cependant, la substitution de la cystéine en position 4 (C132 dans la séquence du SHPR190) permet de maintenir une inhibition correcte de la fonction Rev, avec l'avantage d'éviter la formation de ponts disulfure avec les cystéines intrinsèques en positions 68 et 133, ou avec des cystéines présentes sur d'autres protéines.

Par ailleurs, la mutation de la cystéine 68 présente dans SUMO-1 semble présenter les mêmes intérêts, puisque l'action contre Rev est conservée et nous éliminons la probabilité de former des ponts disulfures et donc de modifier les propriétés du peptide.

d) Le domaine de pénétration peut être remplacé par un domaine polyarginine, mais au détriment de l'activité du SHPR190

Dans la perspective d'une utilisation thérapeutique des molécules SHP, il fallait imaginer une stratégie permettant d'éviter des procédures de thérapie génique lourdes et complexes. Le domaine basique de Tat présente la propriété de rentrer dans les cellules, et permet de faire pénétrer des protéines auxquelles il est fusionné (Frankel and Pabo, 1988; Fawell et al., 1994 ; Schwarze et al., 2000). Puisque les molécules SHP sont destinées à des fins thérapeutiques contre le HIV-1, l'utilisation du domaine de transduction issu de la protéine virale Tat ne semble pas inapproprié. Nous l'avons donc sélectionné pour permettre la libération des molécules dans le milieu intracellulaire.

Cependant, l'usage d'une telle séquence virale pose le problème de son immunogénicité, puisqu'il suppose le développement par l'organisme hôte de réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre ces déterminants antigéniques.

Par ailleurs, la littérature indique qu'il est possible de remplacer cette séquence par un peptide de synthèse aux propriétés similaires, et en particulier par une séquence polyarginine (Futaki et al., 2001). De telles séquences ont été montrées à plusieurs reprises comme étant aussi efficaces voire plus que le PTD de Tat pour la transduction intracellulaire (Futaki et al., 2001 ; Thorèn et al., 2003 ; Fuchs and Raine, 2003).

C'est pourquoi nous avons regardé s'il est possible d'améliorer le pouvoir pénétrant du SHPR190 en remplaçant le PTD de Tat par un motif polyarginine, et sans affecter l'action inhibitrice. Bien que cette substitution ne modifie pas la pénétration du SHP dans les cellules, nous avons constaté que l'activité inhibitrice est réduite par rapport au SHPR190 sauvage. Le domaine de pénétration se situant à proximité de la séquence inhibitrice proprement dite, il est très probable qu'il participe à l'action antivirale du SHPR190. Il semble donc délicat de remplacer la séquence de Tat par une séquence hétérologue, même si celle-ci permet de renforcer le pouvoir pénétrant et réduit l'immunogénicité du SHPR.

e) Le domaine GAD ne peut pas être éliminé complètement de la séquence du SHPR190

Le domaine GAD se situe à proximité de la séquence heptapeptidique 190, puisqu'il a fait partie de la molécule « proie » lors du criblage en double hybride chez la Levure (Roisin et al., 2004). Nous avons imaginé qu'il était possible d'éliminer ce domaine GAD dans la molécule SHPR190, puisque son rôle se limite *à priori* à cette étape de criblage.

Cependant, nous avons observé qu'une partie au moins de la séquence GAD doit être conservée pour ne pas perturber de manière drastique l'activité du SHPR190. Ainsi, seuls les six résidus amino-terminaux (mutation $\Delta G2$) peuvent être éliminés de la séquence SHPR190, et les quatre résidus adjacents à la séquence heptapeptidique doivent être conservés.

1.2.2. Vers une molécule SHPR optimale....

La synthèse des données obtenues dans ces travaux nous a permis d'élaborer une molécule peut-être optimale, mais qui ne serait finalement pas trop modifiée par rapport au SHPR190 initial.

Ainsi, la molécule finale pourra être exempte du motif Flag mais conservera la protéine SUMO-1 ainsi que les résidus alanine / arginine à la place des deux glycines carboxy-terminales. Par ailleurs, nous avons choisi de conserver 6 résidus du domaine GAD (mutation $\Delta G2$) et de substituer les cystéines en positions 68 et 132.

Cependant, des premiers tests sur l'activité de Rev ont indiqué que la molécule ainsi créée n'est pas efficace contre Rev. D'autres analyses doivent être faites afin de confirmer les premiers résultats, en utilisant notamment la lignée stable créée dans notre laboratoire ainsi que des cellules infectées par le HIV-1.

La difficulté évidente d'obtenir une séquence plus efficace que le SHPR190 initialement identifié par double hybride chez la Levure valide cependant la fiabilité et la performance de cette méthode de criblage. Celle-ci permet en effet de définir directement les séquences les plus affines pour un partenaire donné, à l'image de cette étude avec Rev et les SHPR.

Par ailleurs, il semble nécessaire d'effectuer un nouveau criblage, en incluant l'ensemble de la zone de reconnaissance de la séquence SHPR pour Rev. En effet, celle-ci ne se limite pas à la séquence heptapeptidique initialement identifiée, mais elle semble inclure quelques résidus du domaine GAD et du PTD. Il s'avère donc important de réitérer l'étape de criblage, en incluant dans la séquence « proie » les résidus qui semblent participer à l'efficacité du SHPR, à savoir les 6 résidus du domaine GAD (mutation $\Delta G2$) et une partie du PTD, de la séquence Tat ou polyarginine.

Par ailleurs, puisque la séquence du SHPR190 impliquée dans l'action contre Rev ne se limite pas à l'heptapeptide seul, il aurait été intéressant d'analyser l'effet d'une molécule identique mais ne possédant pas l'heptapeptide, ou possédant chaque résidu de la séquence 190 dans un ordre aléatoire. Les résultats auraient permis de confirmer le rôle de la séquence 190 dans l'action inhibitrice.

1.3. Mécanismes de pénétration des SHPR

1.3.1. Le SHPR190 diffuse de manière passive à travers les membranes plasmiques

La libération de protéines à l'intérieur des cellules grâce à des peptides capables de traverser les membranes est une méthodologie assez récente, qui est devenue depuis quelques années

un moyen efficace pour délivrer des molécules thérapeutiques spécifiques afin de modifier les fonctions cellulaires. Ces molécules cargos ne sont pas seulement des protéines, mais aussi des oligopeptides, des oligonucléotides, des billes magnétiques ou encore des liposomes, et on dénombre à l'heure actuelle plus de 100 rapports décrivant le succès de cette méthode pour moduler les fonctions cellulaires (**Figure 72**).

Les peptides à l'origine de cette pénétration partagent un motif appelé « domaine de transduction protéique » ou PTD (Schwarze and Dowdy, 2000). Parmi eux peuvent être cités le domaine basique de Tat (Schwarze et al., 2000), le facteur de transcription VP22 du virus HSV-1 (*Herpes Simplex Virus type 1*) ou encore la pénétratine, un peptide dérivé de la protéine *antennapedia* de la Drosophile (Derossi et al., 1996 ; Schwarze et al., 2000).

De très nombreux travaux ont étudié les propriétés de transduction du PTD de Tat (Fawell et al., 1994 ; Futaki et al., 2001 ; Eguchi et al., 2001). Ainsi, le domaine 48-57 de la séquence de Tat est constitué de résidus basiques et hydrophobes, et permet de faire rentrer des protéines hétérologues à l'intérieur des cellules, indépendamment de leur taille ou de leur fonction (Gius et al., 1999 ; Vocero-Akbani et al., 1999 ; Jin et al., 2001 ; Wang et al., 2002).

Bien que d'un intérêt thérapeutique grandissant, les mécanismes moléculaires responsables de cette propriété intrinsèque inhabituelle sont sujets à de nombreuses controverses. En effet, il a longtemps été proposé que le phénomène de transduction est un processus rapide, indépendant de la température ou de l'énergie, suggérant une pénétration directe à travers la bicouche lipidique des cellules (Fawell et al., 1994 ; Schwarze et al., 2000). En effet, des observations en microscopie de cellules fixées ou des analyses en cytométrie de flux ont montré que l'internalisation n'était pas interrompue lorsque les cellules étaient incubées à basse température ou en présence d'inhibiteurs de l'endocytose. Selon cette hypothèse, un PTD semble potentiellement capable de pénétrer dans tous les types cellulaires, indépendamment de la présence de récepteurs de surface spécifiques.

Toutefois, il est apparu plus tard que les mécanismes intervenant dans le phénomène de pénétration sont plus complexes, et souvent différents en fonction du type cellulaire, de la nature du domaine de pénétration ainsi que du cargo auquel il est fusionné (Richard et al., 2003 ; Futaki, 2006). En particulier, il a été montré que la fixation des cellules pour l'observation en microscopie provoque une rentrée artificielle des PTD, qui fausse les interprétations. En effet, la charge globalement positive des domaines de pénétration permet

de fortes interactions avec les surfaces cellulaires, où ils s'accumulent en forte quantité. Les traitements utilisés pour la fixation des cellules fragilisent les membranes, permettant aux peptides accrochés à la surface des cellules de pénétrer et de s'accumuler dans le noyau par leur affinité pour les acides nucléiques (Lundberg et al., 2003). Par ailleurs, cette forte adhérence sur les membranes cellulaires conduit à une surestimation de la fluorescence lors de l'analyse en cytométrie de flux, qui inclut celle des peptides accrochés à la face externe des membranes plasmiques (Richard et al., 2003, Lundberg et al., 2003). Ces deux artéfacts peuvent désormais être évités, d'une part par la microscopie de cellules vivantes et l'utilisation de groupements fluorescents, et d'autre part par un traitement des cellules (trypsine ou héparine) avant leur analyse en cytométrie de flux, afin de décrocher les molécules accrochées aux membranes (Richard et al., 2003 ; Lundberg et al., 2003).

Ainsi, il a été montré que le PTD de Tat et certains peptides dérivés pénètrent dans les cellules et s'accumulent sous forme de points. Par ailleurs, ce processus serait inhibé par la baisse de température et par la déplétion en ATP cellulaire (Richard et al., 2003). La pénétration du domaine basique de Tat ou de motifs polyarginine impliquerait donc la participation des phénomènes actifs de l'endocytose.

Par ailleurs, des auteurs ont montré que plusieurs types d'endocytose interviennent, distincts notamment de l'endocytose impliquant les vésicules de clathrine, et mettent en avant la participation de composants membranaires pour l'accumulation des peptides à proximité des membranes (Suzuki et al., 2002 ; Fittipaldi et al., 2003). Des travaux plus récents indiquent que les peptides traversent les membranes par macropinocytose (Wadia et al., 2004 ; Nakase et al., 2004). Ce processus implique une réorganisation du cytosquelette d'actine, pour former une exubérance de la face externe de la membrane plasmique, qui va permettre d'engloutir les peptides associés à la membrane.

Ainsi, il semblerait que l'association des peptides à la surface cellulaire, par liaison affine entre les résidus basiques et certains composants membranaires chargés négativement, initie le processus d'internalisation (Vivès, 2003). Les mécanismes d'endocytose, et plus particulièrement la macropinocytose, interviendraient ensuite pour permettre la rentrée des peptides dans la cellule. Ces derniers, ainsi accumulés dans des macropinosomes, atteignent le cytosol probablement en traversant la membrane endosomale complexés à des molécules anioniques (Futaki, 2006) ou en désintégrant cette membrane (Wadia et al., 2004 ; Fuchs and Raines, 2004) (**Figure 73**).

Nos résultats sont en désaccord avec ce modèle, puisqu'ils indiquent que les SHP pénètrent dans les cellules par un mécanisme indépendant de la température et des inhibiteurs de l'endocytose ou de la macropinocytose. Cependant, ils s'accordent avec d'autres auteurs qui montrent que, dans des conditions similaires à celles que nous avons choisies, le PTD de Tat ainsi qu'un motif de sept arginines n'utilisent majoritairement pas la voie de l'endocytose pour rentrer dans les cellules (Thorèn et al., 2003).

Par ailleurs, les observations par microscopie de lymphocytes vivants traités avec un SHP fluorescent ont indiqué que celui-ci est réparti de manière forte dans le noyau, mais également sous forme de points dans le cytoplasme. Cela suppose que, outre la participation majoritaire d'un processus d'internalisation passif, une minorité des protéines pourrait utiliser la voie de l'endocytose, caractérisée par une accumulation typique des protéines sous forme de points cytoplasmiques (Thorèn et al., 2003).

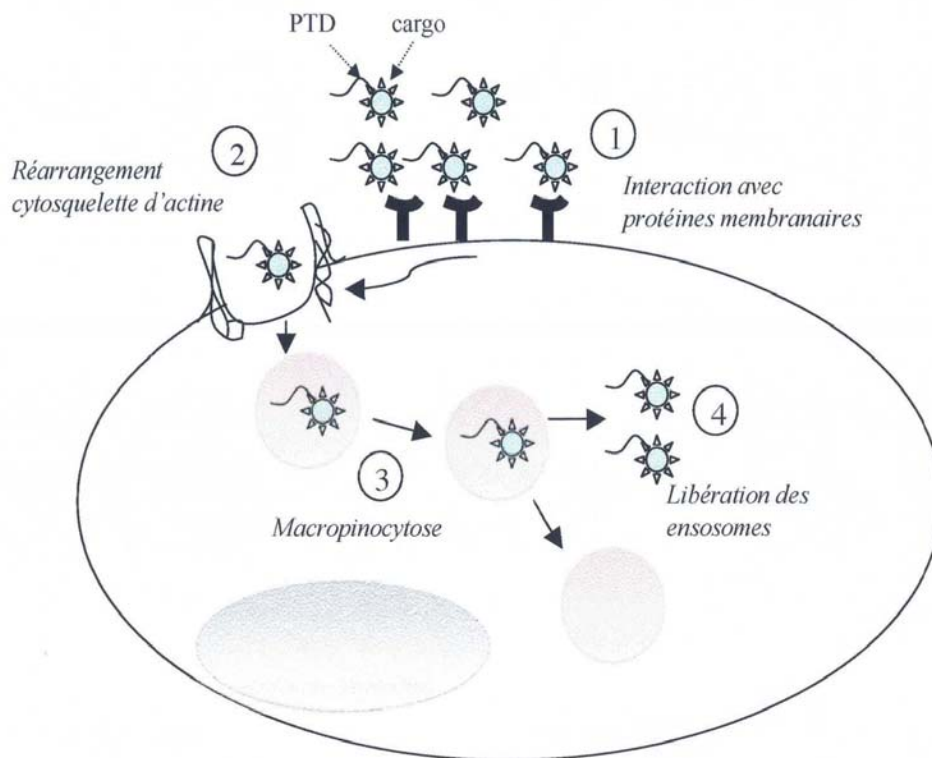


Figure 73 : Modèle de l'internalisation par macropinocytose de peptides de transduction (PTD) riches en arginine

Les cargos fusionnés à un PTD riche en résidus arginine, comme le domaine basique de Tat ou des motifs polyarginine, semblent pénétrer dans les cellules selon un schéma impliquant des réarrangements du cytosquelette d'actine, intervenant lors de la macropinocytose.

Comme déjà mentionné, un élément très important dans la détermination du mode de pénétration dans les cellules est la taille de la molécule à internaliser. En effet, les petits cargos, à l'image de séquences de pénétration d'une dizaine d'acides aminés, sont aisément capables de diffuser à travers les membranes cellulaires. A l'inverse, de plus grosses molécules, fusionnées à un PTD, nécessitent l'intervention de vésicules d'endocytose, qui les engloberont dans leur totalité et les feront passer dans le milieu intracellulaire.

En ce qui concerne l'import des SHP jusqu'au noyau, nos résultats indiquent que ce processus est affecté par la température, puisque l'accumulation des peptides dans le noyau semble réduite à 4°C. D'autres auteurs ont également observé une distribution diffuse de molécules

internalisées dans les cellules, réparties à la fois dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques, sans toutefois donner de véritable explication à cette modification de localisation intracellulaire (Thorèn et al., 2003). Par ailleurs, la participation de récepteurs de l'import comme ceux de la famille des importines soutient l'hypothèse qu'il s'agit d'un phénomène actif, et donc dépendant de la température et de l'énergie.

Cependant, la baisse apparente de l'accumulation du SHPR190 dans le noyau pourrait également résulter d'une compartimentalisation particulière du peptide dans des vésicules présentes dans le cytoplasme. En effet, le SHPR190 pourrait être accumulé dans des compartiments cellulaires particuliers, d'où il sort dans des conditions de température normales, mais où il resterait séquestré à basse température. Cette hypothèse pourrait être validée par les observations en microscopie, qui montrent une fluorescence, correspondant au SHP marqué, sous forme de points dans le cytoplasme.

Enfin, et en accord avec la littérature, la distribution des SHP que nous avons observée dans des cellules vivantes diffère de celle obtenue lorsque les lymphocytes avaient été fixés, pour l'immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Flag, présent sur les SHP (Roisin et al., 2004). En effet dans ce cas, les SHP apparaissaient de manière diffuse dans l'ensemble de la cellule. Ces résultats, bien que montrant d'ores et déjà l'internalisation des SHP dans les cellules, sont désormais confirmés dans des cellules vivantes.

1.3.2. L'affinité pour les membranes cellulaires dépend de la nature du PTD

L'étude des différents domaines de pénétration a permis de définir certains attributs de ces séquences qui semblent favorables à la pénétration intracellulaire. En effet, nos données indiquent que la nature du domaine de pénétration dirige l'intensité des interactions avec les membranes cellulaires, et pourrait par conséquent gouverner une partie du processus de transduction.

Nous avons ainsi observé que le renforcement de l'hélice alpha du domaine basique de Tat (PTD2) réduit l'affinité du motif pour les membranes. Des auteurs ont montré au contraire qu'un tel domaine est très actif pour promouvoir la rentrée dans les cellules (Ho et al., 2001).

Cependant, ces études ont été menées sur de petites séquences formées d'un domaine PTD groupé à la fluorescéine, et par des observations de cellules fixées.

Il est évident que la différence de taille entre les peptides étudiés par ces auteurs et les SHP explique, du moins en partie, les divergences obtenues.

De la même manière, des motifs basiques plus hétérogènes que le PTD de Tat n'ont pas prouvé leur efficacité (PTD3, PTD4, PTD6).

Par contre, nous avons montré que des motifs de 7 ou 9 arginine (PTD5 et PTD7) sont relativement avides pour les membranes cellulaires. Ces résultats sont en accord avec la littérature, qui montre une pénétration forte de protéines fusionnées à des motifs de 8 à 10 arginines (Futaki et al., 2001 ; Fuchs and Raine, 2003, Thorèn et al., 2003). Cependant, la longueur de la chaîne polyarginine semble également être un facteur important pour la pénétration, puisqu'un motif de 11 arginines (PTD8) n'est plus actif pour promouvoir la rentrée dans les cellules.

D'autres auteurs ont montré que, dans des cellules fixées, l'augmentation du nombre d'arginine au delà de huit résidus réduit l'efficacité d'internalisation des peptides, alors qu'il n'en est pas le cas sur cellules vivantes (Nakase et al., 2004). Nos résultats seraient en accord avec les observations sur cellules fixées, qui suggèrent des différences d'affinité pour les membranes, mais ne trouvent également pas de véritable interprétation (Lundberg et al., 2003). Les divergences peuvent également être expliquées par l'utilisation de molécules cargos différentes. En effet, comme déjà mentionné, l'efficacité de transduction dépend intimement des propriétés intrinsèques de la protéine fusionnée au PTD, en particulier sa taille, sa structure tertiaire, sa forme et sa polarité.

Nous avons observé qu'une chaîne polylysine (PTD9) possède une bonne affinité pour les membranes cellulaires. Plusieurs auteurs ont montré qu'il est possible, grâce à une séquence polylysine, de faire rentrer dans les cellules des macromolécules comme la β -galactosidase (Mai et al., 2002) ou la catalase (Jin et al., 2001). D'autres auteurs ont également indiqué qu'une protéine fusionnée à ce motif et dénaturée pénètre mieux que la même protéine fixée au PTD de Tat (Park et al., 2002). Il semble donc que les résidus lysines, à l'image des arginines, sont capables de s'associer aux membranes, et dans certains cas d'induire la pénétration intracellulaire.

Cependant, d'autres auteurs suggèrent le contraire et stipulent l'importance des groupements guanidine des arginines (Suzuki et al., 2002 ; Thorèn et al., 2003). Selon leur hypothèse, les groupements guanidine des arginines semblent essentiels pour les interactions avec des composants membranaires, qui peuvent être des protéines anioniques exposées à la surface cellulaire ou insérées dans la membrane, des chaînes glycosylées de glycoprotéines extracellulaires -comme les glycosaminoglycans -, ou encore les extrémités des phospholipides membranaires.

Par ailleurs, plusieurs rapports soulèvent l'importance de composés polysulfonés comme les glycosaminoglycans (GAG) pour la transduction. En effet, l'absence de ces derniers de la surface cellulaire bloque le phénomène de pénétration, qui est également inhibé en présence de composés saccharides et/ou sulfonés solubles comme les GAG ou l'héparine, pour lesquels le PTD de Tat possède une forte affinité (Hakansson et al., 2001 ; Tyagi et al., 2001 ; Suzuki et al., 2002). De tels composés pourraient permettre l'accumulation des peptides PTD à la membrane plasmique, processus qui pourrait favoriser l'internalisation sans pour autant être nécessaire (Futaki et al., 2003). Ainsi, le type de cellules utilisé pour évaluer la pénétration des PTD est également un facteur pouvant influencer les résultats.

1.3.3. Conclusions....

Il semble bien délicat de réunir l'ensemble des données obtenues par les nombreux travaux réalisés pour comparer l'efficacité de transduction des différents PTD. En effet, les résultats sont souvent contradictoires, et il est impossible d'établir des conclusions universelles quant à l'activité de ces PTD.

Il est évident que ces différences sont principalement dues à l'utilisation de séquences peptidiques très variées et de types cellulaires distincts. En effet, la séquence des différents PTD testés dans ces études module très probablement les interactions avec certains composants membranaires, et elle est responsable de l'affinité très variable des cargos pour les membranes cellulaires. Ces interactions impliquent des liaisons électrostatiques entre les groupements chargés positivement sur le PTD et des composants anioniques de la membrane.

Il est également probable que des reconnaissances plus spécifiques interviennent, comme il en est le cas avec les groupements guanidine des arginines. De telles interactions expliqueraient pourquoi certains auteurs ont observé qu'un peptide composé de quatre arginine (R4) pénètre beaucoup moins bien qu'un peptide R8 ou R16, puisqu'il n'implique qu'une faible association avec la membrane (Nakase et al., 2004). Par ailleurs, l'adhérence des molécules sur les membranes semble affectée par l'expression de certaines protéines à la surface des cellules, ce qui explique les résultats parfois controversés obtenus en fonction du type cellulaire utilisé.

La nature de la molécule cargo contribue aussi de manière forte à l'efficacité de pénétration, et elle détermine également le mécanisme utilisé pour traverser les membranes cellulaires. En particulier, la taille de la molécule joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de transduction et dans le processus utilisé pour la pénétration. En effet, on peut imaginer que les petites molécules peuvent diffuser à travers les membranes, alors que les cargos de plus grosse taille nécessitent la formation de larges vésicules comme celles formées par macropinocytose.

Enfin, il a été montré que des protéines dénaturées pénètrent mieux dans les cellules, la dénaturation réduisant les contraintes structurales pouvant bloquer le passage à travers les membranes (Park et al., 2002). Le niveau de repliement de la molécule cargo semble donc intervenir dans le processus de transduction. Un tel scénario a été vérifié dans le cas des SHP (non illustré), mais aucune différence d'efficacité de pénétration n'a été observée entre les formes native ou dénaturée du peptide. Ainsi, la taille des SHP, leur polarité et la nature du PTD, semblent donc intervenir dans leur action, mais pas leur conformation.

II. Bilan de l'étude de la régulation de Rev par l'ubiquitine et SUMO-1

II.1. Rev et l'ubiquitine

II.1.1. Rev est polyubiquitylée dans des cellules transfectées

Dans cette dernière partie du travail, nous avons montré que la protéine Rev est ubiquitylée dans une lignée cellulaire adhérente transfectée. Ainsi, dans un contexte où la concentration intracellulaire en ubiquitine est renforcée, nous avons observé des formes polyubiquitylées de la protéine virale. Par ailleurs, nous avons observé un profil de migration principalement dans les très hauts poids moléculaires, et aucune bande n'est visible à des positions plus basses, ce qui indique l'absence d'addition d'un ou peu de monomères d'ubiquitine sur Rev.

Cependant, nous n'avons pas examiné si la protéine virale est pareillement modifiée dans des conditions cellulaires physiologiques, c'est-à-dire dans des cellules infectées par le HIV-1. Il serait intéressant d'étudier le profil de migration des protéines Rev exprimées dans le cadre d'une infection, en utilisant une lignée cellulaire ciblée par le HIV-1, comme par exemple une lignée lymphoïde, et chroniquement infectée par un provirus exprimant la protéine virale.

Toutefois, de telles investigations se heurtent à des problèmes techniques certains. En effet, le niveau de protéines Rev présentes dans des cellules infectées est très faible, puisqu'elle exerce un effet rétroactif négatif sur sa propre expression. Dans un tel contexte, il semble évidemment difficile d'extraire par immunoprécipitation les protéines Rev, ainsi que d'en visualiser les formes polyubiquitylées.

L'ubiquitylation consiste à conjuguer un monomère d'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat. Afin de déterminer le résidu cible de cette modification sur Rev, nous avons réalisé une mutagenèse exhaustive de ses trois lysines en arginine, acide aminé permettant de conserver une charge électrique similaire. Nous avons ainsi montré que la lysine en position pénultième dans la séquence Rev, c'est-à-dire la lysine 115, est la cible de l'ubiquitylation. En effet, la mutation de cette lysine bloque la fixation des chaînes d'ubiquitine sur la protéine virale, et nous ne détectons plus de produits modifiés.

L'analyse comparative de séquences connues de Rev parmi les différents isolats de HIV-1 montre que la lysine 115 est relativement bien conservée, et particulièrement dans les sous-types A et B (**Figure 74**). Cette conservation suggère l'importance de cette lysine pour une activité optimale de la protéine virale, et suppose que l'ubiquitylation de Rev est une modification récurrente parmi les différents isolats de HIV-1.

<i>Sous type</i>	<i>Nombre de séquences</i>	<i>Nombre de séquences avec K en position -1</i>	<i>Pourcentage de séquences avec K en -1</i>
A	62	48	77,4%
B	96	85	88,5%
C	36	3	8,3%
D	44	26	59,1%
F	10	8	80%
G	4	4	100%
H	3	3	100%
J	2	2	100%
K	2	2	100%

Figure 74 : La lysine en position pénultième à l'extrémité carboxy-terminale de Rev est relativement bien conservée.

Les séquences de Rev issues des différents isolats de HIV-1 proviennent de la banque de données de HIV (<http://www.hiv.lanl.gov>). Les séquences des sous types du groupe M ont été alignées à l'aide du Programme Clustal W (<http://pbil.univ-luonyl.fr>).

Le tableau indique le nombre de séquences alignées pour chaque sous type de HIV-1, le nombre de séquences possédant un résidu lysine (K) en position pénultième à l'extrémité carboxy-terminale ainsi que son pourcentage.

II.1.2. Les formes polyubiquitylées de Rev sont plus stables mais moins actives dans la cellule

L'analyse de l'abondance intracellulaire de la protéine Rev sauvage et des différents mutants lysine a montré que la mutation de la lysine cible de l'ubiquitylation, K115, provoque une forte déstabilisation de la protéine virale. Ainsi la formation de longues chaînes de

polyubiquitine sur Rev ne déstabilise pas la protéine, mais semble au contraire corrélée avec une augmentation de sa concentration intracellulaire.

Un rôle non déstabilisateur de l'ubiquitylation a été documenté pour d'autres protéines virales. En particulier, il a été montré que l'ubiquitylation de la protéine régulatrice Tat du HIV-1 n'induit pas sa dégradation mais exerce un effet positif sur son activité transcriptionnelle (Bres et al., 2003). Par ailleurs, la polyubiquitylation du transactivateur Tax du virus HTLV-1 module son activité (Peloponese et al., 2004), et régule ses fonctions nucléaires et cytoplasmiques sur la voie NF- κ B (Nasr et al., 2006). D'une manière similaire à Tax, il semblerait que l'ubiquitylation de Rev atténue son activité, puisque l'absence de conjugaison de l'ubiquitine sur Rev s'accompagne d'une très légère augmentation de sa fonction.

Par ailleurs, certains facteurs de transcription, généralement instables, deviennent stables mais inactifs une fois ubiquitylés, la région cible de l'ubiquitylation étant celle nécessaire à leur activation (Muratani and Tansey, 2003). Il est possible qu'il en soit ainsi pour Rev, puisque nous avons vu que la liaison de l'ubiquitine renforce sa stabilité mais réduit son activité. La région cible de l'ubiquitylation serait alors probablement partagée avec un facteur cellulaire ou viral impliqué dans l'activité de Rev.

Selon cette hypothèse, il est probable que les chaînes de polyubiquitine empêchent la fixation de partenaires cellulaires de Rev comme hCRM1, ou perturbent sa liaison avec les ARNm viraux. En effet, la conjugaison d'un ou plusieurs monomères d'ubiquitine sur un substrat modifie sa conformation et peut altérer ses domaines d'interaction avec des co-facteurs. De cette manière, l'ubiquitylation joue le rôle d'interrupteur pour diriger avec précision les interactions moléculaires intervenant dans les fonctions de diverses protéines. Les longues chaînes de polyubiquitine fixées sur Rev pourraient cacher tout ou partie des domaines d'interaction avec un facteur cellulaire ou viral, ou entrer en compétition sur le site de liaison pour ce partenaire.

Il est également possible que l'ubiquitine affecte la répartition de Rev dans la cellule, puisque le mutant RevK115R s'accumule préférentiellement dans le noyau. Bien qu'aucun rôle de l'ubiquitine sur le transport nucléo-cytoplasmique de protéines navettes ne soit vraiment établi, il a été montré que la protéine SUMO-1, une protéine apparentée à l'ubiquitine, dirige

la compartimentalisation de certaines protéines cellulaires (Matunis et al., 1996) ou virales (Rangasamy et al., 2000). Nous pouvons alors imaginer que les chaînes d'ubiquitine formées sur Rev jouent un rôle dans sa translocation à travers le noyau. En effet, si cette modification a lieu dans le cytoplasme, elle pourrait bloquer l'import de Rev jusqu'au noyau, où elle prend normalement en charge les messagers viraux. Par contre, si l'ubiquitine fixe Rev dans le noyau, elle pourrait intervenir dans la translocation de la protéine virale jusque dans le compartiment cytoplasmique.

Il semble très intéressant d'étudier le comportement de la protéine Rev mutée sur sa lysine en position pénultième dans un contexte cellulaire physiologique. En effet, il est techniquement possible d'introduire cette mutation dans une séquence provirale, puis d'infecter des cellules lymphoïdes avec cette construction. L'analyse de l'efficacité de la réplication virale ou le suivi du profil des ARNm viraux présents dans ces cellules permettraient de définir le véritable rôle de l'ubiquitine sur la fonction de cette protéine virale.

II.1.3. Rôles des chaînes d'ubiquitine K33 et K27 sur les substrats

La formation de chaînes de polyubiquitine sur un substrat monoubiquitylé fait intervenir un résidu lysine spécifique sur l'ubiquitine. Ce résidu lysine détermine la conformation adoptée par la chaîne de polyubiquitine fixée sur le substrat. Ces différents types de chaînes d'ubiquitine induisent des signaux variables qui jouent un rôle spécifique sur la fonction du substrat (Pickart and Fushman, 2004). En particulier, les chaînes d'ubiquitine K48 ciblent classiquement le substrat vers la dégradation par le protéasome. A l'inverse, les chaînes K63 régulent l'activité de leur substrat et interviennent dans sa localisation intracellulaire ou dans ses interactions avec d'autres facteurs.

Le rôle des chaînes K11 n'est pas encore bien établi, bien qu'elles semblent induire la dégradation par le protéasome *in vitro* (Baboshina and Haas, 1996). De la même manière, les chaînes d'ubiquitine impliquées dans l'adressage de certains substrats vers le protéasome 26S semblent pouvoir s'initier via la lysine 29 (Koegl et al., 1999).

Le rôle des chaînes impliquant les lysines 6, 27 ou 33 est quant à lui moins bien connu. Des auteurs ont montré que le suppresseur de tumeur BRCA1 complexé à BARD1 peut être polyubiquitylé par des chaînes K6, ce qui semble stabiliser le complexe (Wu-Baer et al., 2003). Par ailleurs, cette modification particulière aurait un rôle dans l'activité de BRCA1/BARD1, indiquant l'importance biologique des chaînes d'ubiquitine K6.

Nous avons étudié le type de chaînes d'ubiquitine formé sur Rev, en utilisant des mutants de l'ubiquitine pour lesquels une seule des sept lysines est fonctionnelle, les autres étant mutées en arginine, substitution qui permet de conserver la charge positive globale de la protéine. Nous avons ainsi montré que la liaison entre les monomères d'ubiquitine, pour former une chaîne fixée sur Rev, s'effectue principalement via la lysine 33, et dans une moindre mesure via les lysines 27 et 63. Ces données expliquent pourquoi les formes polyubiquitylées de Rev ne sont pas massivement dégradées, puisque la lysine 48 n'intervient pas dans le branchement de l'ubiquitine sur Rev.

Il est maintenant bien documenté que les chaînes K63 peuvent réguler les interactions protéiques des substrats ou leur distribution dans la cellule. La participation probable de K63 dans la modification de Rev suppose un rôle régulateur de l'ubiquitine dans les interactions entre Rev et sa cible virale ou un partenaire cellulaire, ou sur sa localisation intracellulaire.

Des auteurs ont montré, par une approche protéomique, qu'un branchement par la lysine 33 est possible chez la Levure, ce qui suggère que cette lysine pourrait être impliquée dans la régulation des fonctions protéiques (Peng et al., 2003). Cependant chez les mammifères, aucun rapport n'a établi un tel type de branchement. Le rôle de cette lysine ainsi que celui de K27 n'est donc à l'heure actuelle pas encore défini. Nos observations leur suggèrent un rôle non protéolytique, et stipulent que ce type de chaîne d'ubiquitine pourrait participer, à l'image des chaînes K63, à la modulation des interactions protéiques ou à la localisation intracellulaire des substrats.

II.2. Rev et SUMO-1

L'ensemble des travaux réalisés sur des cellules adhérentes transfectées avec la protéine SUMO-1 indique que Rev n'est pas modifiée par sumoylation dans un tel contexte cellulaire.

L'hypothèse que l'ubiquitylation et la sumoylation pourraient entrer en compétition pour la fixation sur la lysine 115 de Rev est donc exclue, et la protéine SUMO-1 ne semble pas intervenir dans la régulation de la fonction Rev.

Il aurait malgré tout été intéressant de vérifier ces résultats dans des cellules infectées par le HIV-1. En effet, la transfection de cellules et la surexpression de protéines spécifiques qui en

résulte peuvent perturber certaines fonctions cellulaires. Par ailleurs, il est possible que les protéines SUMO-1 soient affectées à d'autres substrats cellulaires et modifient ainsi leur comportement. Dans des cellules infectées, les concentrations intracellulaires des protéines virales et cellulaires sont à leur équilibre physiologique, ce qui permettrait de conclure de manière exhaustive quant à la régulation de Rev par SUMO-1.

Une expérience intéressante serait également de bloquer la voie de sumoylation, puis de regarder le comportement de Rev. En effet, il est possible d'inhiber la sumoylation par l'expression de la protéine adénovirale Gam-1, qui est capable de fixer l'enzyme E1 intervenant dans le branchement de SUMO sur un substrat (Colombo et al., 2002). Par des expériences de transfection transitoire, nous pourrions évaluer si l'activité de Rev est modifiée lorsque les processus de sumoylation sont bloqués.

II.3. Autres modifications de Rev?

Nous avons mis en évidence que Rev peut être polyubiquitylée, et que cette modification augmente sa concentration dans la cellule mais module son activité. Nous avons également montré que Rev n'est pas modifiée par la protéine SUMO-1, qui n'intervient pas dans la régulation de la protéine virale. Il est également connu que Rev est phosphorylée sur plusieurs de ses résidus sérine, mais que ces modifications n'ont pas d'impact particulier sur sa fonction (Cochrane et al., 1989a ; Cochrane et al., 1989b).

Les résidus lysines des protéines peuvent également être les cibles d'autres modifications, comme l'acétylation, la méthylation, l'hydroxylation. Toutes ces modifications permettent de réguler les interactions des substrats avec d'autres protéines, et gouvernent ainsi les fonctions, les interactions, et la localisation intracellulaire de nombreuses protéines cellulaires ou virales.

Par exemple, la protéine Tat du HIV-1 subit diverses modifications qui permettent de réguler très finement les différentes étapes intervenant dans sa fonction transactivatrice (Hetzer et al., 2005). Elle est en effet modifiée par acétylation, méthylation, ubiquitylation et sumoylation,

selon une hiérarchie coordonnée dans le temps et dans l'espace afin de permettre l'activation de la transcription du génome viral.

Il a également été montré que la phosphorylation de la protéine p53 sur différents résidus sérine régule son activité, en recrutant des partenaires cellulaires ou en permettant d'autres modifications post-traductionnelles. Par exemple, la phosphorylation des sérines 18 et 20 de p53 permet l'acétylation des lysines carboxy-terminales, ce qui empêche son ubiquitylation (Bode and Dong, 2004).

Nous avons ciblé notre étude sur les rôles de l'ubiquitine et de SUMO-1 dans la fonction Rev, mais d'autres modifications post-traductionnelles pourraient également intervenir, pour catalyser la liaison de l'ubiquitine sur Rev ou pour permettre des interactions particulières avec des facteurs cellulaires. Par ailleurs, il est possible que plusieurs modifications post-traductionnelles s'exercent sur Rev en fonction de la progression du cycle viral ou selon l'état de la cellule hôte, pour moduler de manière extrêmement fine l'activité de cette protéine virale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D. & Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* **103**, 667-73.
- Adachi, Y. & Yanagida, M. (1989). Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crml+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* **108**, 1195-207.
- Adachi, Y. (1999). Nucleocytoplasmic transport of preintegration complex and viral mRNA in retrovirus-infected cells. *ICR Annual Report* **6**.
- Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M. G., Proudfoot, A. E., Alouani, S., Wells, T. N., Mariani, G., Rabin, R. L., Farber, J. M. & Noonan, D. M. (1998). HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13153-8.
- Amendt, B. A., Hesslein, D., Chang, L. J. & Stoltzfus, C. M. (1994). Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* **14**, 3960-70.
- Apcher, G. S., Heink, S., Zantopf, D., Kloetzel, P. M., Schmid, H. P., Mayer, R. J. & Kruger, E. (2003). Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Lett* **553**, 200-4.
- Apolloni, A., Hooker, C. W., Mak, J. & Harrich, D. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication. *J Virol* **77**, 9912-21.
- Ariumi, Y. & Trono, D. (2006). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) protein can enhance human immunodeficiency virus type 1 replication by stimulating Rev function. *J Virol* **80**, 2445-52.
- Arnold, M., Nath, A., Hauber, J. & Kehlenbach, R. H. (2006). Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem* **281**, 20883-90.
- Arrigo, S. J., Weitsman, S., Rosenblatt, J. D. & Chen, I. S. (1989). Analysis of rev gene function on human immunodeficiency virus type 1 replication in lymphoid cells by using a quantitative polymerase chain reaction method. *J Virol* **63**, 4875-81.
- Arrigo, S. J. & Chen, I. S. (1991). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev* **5**, 808-19.
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L. & Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* **273**, 33414-22.
- Baboshina, O. V. & Haas, A. L. (1996). Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2_{EPF} and RAD6 are recognized by 26S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* **271**, 2823-31.
- Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.
- Bai, J., Sui, J., Zhu, R. Y., Tallarico, A. S., Gennari, F., Zhang, D., & Marasco, W. A. (2003). Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclin T1 intrabodies. *J Biol Chem* **278**, 1433-1442.
- Bampi, C., Jacquenet, S., Lener, D., Decimo, D. & Darlix, J. L. (2004). The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Curr HIV Res* **2**, 79-92.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71.

- Barrientos, A. & Moraes, C. T. (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* **274**, 16188-97.
- Bartel, D. P., Zapp, M. L., Green, M. R. & Szostak, J. W. (1991). HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* **67**, 529-36.
- Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D. & Williamson, J. R. (1996). Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science* **273**, 1547-51.
- Benko, D. M., Schwartz, S., Pavlakis, G. N. & Felber, B. K. (1990). A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J Virol* **64**, 2505-18.
- Berkhout, B., Silverman, R. H. & Jeang, K. T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**, 273-82.
- Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H. & Pandolfi, P. P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* **6**, 665-72.
- Berthoux, L., Pechoux, C., Ottmann, M., Morel, G. & Darlix, J. L. (1997). Mutations in the N-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein affect virion core structure and proviral DNA synthesis. *J Virol* **71**, 6973-81.
- Bevec, D., Dobrovnik, M., Hauber, J. & Bohnlein, E. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9870-4.
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wohl, T., Himmelspach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettnitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F. & Hauber, J. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **271**, 1858-60.
- Blot, V., Perugi, F., Gay, B., Prevost, M. C., Briant, L., Tangy, F., Abriel, H., Staub, O., Dokhlar, M. C. & Pique, C. (2004). Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci* **117**, 2357-67.
- Bobbitt, K. R., Addo, M. M., Altfeld, M., Filzen, T., Onafuwa, A. A., Walker, B. D. & Collins, K. L. (2003). Rev activity determines sensitivity of HIV-1-infected primary T cells to CTL killing. *Immunity* **18**, 289-99.
- Bode, A. M. & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 793-805.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. & Ramratnam, B. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* **77**, 11531-5.
- Boe, S. O., Bjorndal, B., Rosok, B., Szilvay, A. M. & Kalland, K. H. (1998). Subcellular localization of human immunodeficiency virus type 1 RNAs, Rev, and the splicing factor SC-35. *Virology* **244**, 473-82.
- Bogerd, H. & Greene, W. C. (1993). Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo. *J Virol* **67**, 2496-502.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. & Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**, 485-94.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J. & Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* **16**, 4207-14.

- Boggio, R. & Chiocca, S. (2006). Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr Opin Microbiol* **9**, 430-6.
- Borden, K. L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle : possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* **22**, 5259-69.
- Boulanger, M. C., Liang, C., Russell, R. S., Lin, R., Bedford, M. T., Wainberg, M. A. & Richard, S. (2005). Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* **79**, 124-31.
- Brady, J. & Kashanchi, F. (2005). Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* **2**, 69.
- Bres, V., Kiernan, R., Emiliani, S. & Benkirane, M. (2002). Tat acetyl-acceptor lysines are important for human immunodeficiency virus type-1 replication. *J Biol Chem* **277**, 22215-21.
- Bres, V., Kiernan, R. E., Linares, L. K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Treand, C., Emiliani, S., Peloponese, J. M., Jeang, K. T., Coux, O., Scheffner, M. & Benkirane, M. (2003). A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol* **5**, 754-61.
- Bukrinsky, M. & Adzhubei, A. (1999). Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol* **9**, 39-49.
- Buonaguro, L., Barillari, G., Chang, H. K., Bohan, C. A., Kao, V., Morgan, R., Gallo, R. C. & Ensoli, B. (1992). Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol* **66**, 7159-67.
- Buonomo, S. B., Michienzi, A., De Angelis, F. G. & Bozzoni, I. (1999). The Rev protein is able to transport to the cytoplasm small nucleolar RNAs containing a Rev binding element. *Rna* **5**, 993-1002.
- Campbell, E. M., Nunez, R. & Hope, T. J. (2004). Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **78**, 5745-55.
- Campbell, G. R., Watkins, J. D., Esquieu, D., Pasquier, E., Loret, E. P. & Spector, S. A. (2005). The C terminus of HIV-1 Tat modulates the extent of CD178-mediated apoptosis of T cells. *J Biol Chem* **280**, 38376-82.
- Campbell, L. H., Borg, K. T., Haines, J. K., Moon, R. T., Schoenberg, D. R. & Arrigo, S. J. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs. *J Virol* **68**, 5433-8.
- Campbell, S. & Rein, A. (1999). In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**, 2270-9.
- Cancio, R., Spadari, S. & Maga, G. (2004). Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* **383**, 475-82.
- Caputi, M., Freund, M., Kammler, S., Asang, C. & Schaal, H. (2004). A bidirectional SF2/ASF- and SRp40-dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression. *J Virol* **78**, 6517-26.
- Carroll, R., Martarano, L. & Derse, D. (1991). Identification of lentivirus tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. *J Virol* **65**, 3460-7.
- Chakraborti, S. & Banerjee, A. C. (2003). Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol Ther* **7**, 817-26.
- Chan, H. J., Weng, J. J. & Yung, B. Y. (2005). Nucleophosmin/B23-binding peptide inhibits tumor growth and up-regulates transcriptional activity of p53. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 396-403.

- Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**, 465-70.
- Chen, D., Wang, M., Zhou, S. & Zhou, Q. (2002). HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Embo J* **21**, 6801-10.
- Cheng-Mayer, C., Iannello, P., Shaw, K., Luciw, P. A. & Levy, J. A. (1989). Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**, 1629-32.
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Chopin, C., Bex, F. & Pique, C. (2004). Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol* **78**, 11823-32.
- Chin, D. J. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev-Rev-response element complex formation by complementary oligonucleotides. *J Virol* **66**, 600-7.
- Chiu, Y. L. & Greene, W. C. (2006). The APOBEC3G cytidine deaminases : distinct antiviral actions along the retroviral cycle. *J Biol Chem* **281**, 8309-12.
- Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A. L. (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* **77**, 40-51.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R. & Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* **11**, 1287-9.
- Clapham, P. R. & McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* **83**, 1809-29.
- Cmarko, D., Boe, S. O., Scassellati, C., Szilvay, A. M., Davanger, S., Fu, X. D., Haukenes, G., Kalland, K. H. & Fakan, S. (2002). Rev inhibition strongly affects intracellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Virol* **76**, 10473-84.
- Coburn, G. A. & Cullen, B. R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* **76**, 9225-31.
- Cochrane, A., Kramer, R., Ruben, S., Levine, J. & Rosen, C. A. (1989a). The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**, 264-6.
- Cochrane, A. W., Golub, E., Volsky, D., Ruben, S. & Rosen, C. A. (1989b). Functional significance of phosphorylation to the human immunodeficiency virus Rev protein. *J Virol* **63**, 4438-40.
- Cochrane, A. W., Perkins, A. & Rosen, C. A. (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* **64**, 881-5.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A. & Khochbin, S. (2001). The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem* **276**, 28179-84.
- Col, E., Caron, C., Chable-Bessia, C., Legube, G., Gazzeri, S., Komatsu, Y., Yoshida, M., Benkirane, M., Trouche, D. & Khochbin, S. (2005). HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *Embo J* **24**, 2634-45.
- Cole, C. N. & Saavedra, C. (1997). Regulation of the export of RNA from the nucleus. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 71-8.
- Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G. F., & Chiocca, S. (2002). The adenovirus protein Gam-1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *Embo Rep* **3**(11), 1062-68.
- Cook, K. S., Fisk, G. J., Hauber, J., Usman, N., Daly, T. J. & Rusche, J. R. (1991). Characterization of HIV-1 REV protein: binding stoichiometry and minimal RNA substrate. *Nucleic Acids Res* **19**, 1577-83.

- Cory, S., Huang, D. C. & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family : roles in cell survival and oncogenesis. *22*, 8590-607.
- Costa, L. J., Zheng, Y. H., Sabotic, J., Mak, J., Fackler, O. T. & Peterlin, B. M. (2004). Nef binds p6* in GagPol during replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **78**, 5311-23.
- Cullen, B. R., Hauber, J., Campbell, K., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. & Rosen, C. A. (1988). Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product. *J Virol* **62**, 2498-501.
- Cullen, B. R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**, 685-92.
- Cullen, B. R. (2003). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**, 419-24.
- Cullen, B. R. (2005). Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* **433**, 26-7.
- D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E. & Pavlakis, G. N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol* **12**, 1375-86.
- Daly, T. J., Rennert, P., Lynch, P., Barry, J. K., Dundas, M., Rusche, J. R., Doten, R. C., Auer, M. & Farrington, G. K. (1993). Perturbation of the carboxy terminus of HIV-1 Rev affects multimerization on the Rev responsive element. *Biochemistry* **32**, 8945-54.
- Dave, R. S. & Pomerantz, R. J. (2004). Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains. *J Virol* **78**, 13687-96.
- Dayton, A. I., Terwilliger, E. F., Potz, J., Kowalski, M., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1988). Cis-acting sequences responsive to the rev gene product of the human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* **1**, 441-52.
- Dayton, A. I. (2004). Within you, without you: HIV-1 Rev and RNA export. *Retrovirology* **1**, 35.
- Dayton, E. T., Powell, D. M. & Dayton, A. I. (1989). Functional analysis of CAR, the target sequence for the Rev protein of HIV-1. *Science* **246**, 1625-9.
- Demirov, D. G. & Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. *Virus Res* **106**, 87-102.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* **271**, 18188-93.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**, 233-9.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., Skinner, M. A. & Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6925-9.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A. & Gottlinger, H. G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* **68**, 1689-96.
- Doye, V. & Hurt, E. (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 401-11.
- Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M. A., Oakes, J. W. & Pomerantz, R. J. (1994). Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5075-9.

- Duan, L., Zhu, M., Ozaki, I., Zhang, H., Wei, D. L. & Pomerantz, R. J. (1997). Intracellular inhibition of HIV-1 replication using a dual protein- and RNA-based strategy. *Gene Ther* **4**, 533-43.
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M. & Nakanishi, M. (2001). Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem* **276**, 26204-10.
- Fabre, E. & Hurt, E. (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annual Review of Genetics* **31**, 277-313.
- Fang, J., Kubota, S. & Pomerantz, R. J. (2002). A trans-dominant negative HIV type 1 Rev with intact domains of NLS/NOS and NES. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 705-9.
- Fang, J., Acheampong, E., Dave, R., Wang, F., Mukhtar, M. & Pomerantz, R. J. (2005). The RNA helicase DDX1 is involved in restricted HIV-1 Rev function in human astrocytes. *Virology* **336**, 299-307.
- Farjot, G., Sergeant, A. & Mikaelian, I. (1999). A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* **274**, 17309-17.
- Favaro, J. P., Borg, K. T., Arrigo, S. J. & Schmidt, M. G. (1998). Effect of Rev on the intranuclear localization of HIV-1 unspliced RNA. *Virology* **249**, 286-96.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. & Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 664-8.
- Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. & Pavlakis, G. N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1495-9.
- Felber, B. K., Drysdale, C. M. & Pavlakis, G. N. (1990). Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol* **64**, 3734-41.
- Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**, 394-401.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R. & Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *Embo J* **13**, 4105-12.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-83.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F. & Giacca, M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* **278**, 34141-9.
- Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K. G., Fransen, J. & Grosveld, G. (1997a). The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *Embo J* **16**, 807-16.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. (1997b). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-60.
- Frankel, A. D. & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-93.
- Fridell, R. A., Fischer, U., Luhrmann, R., Meyer, B. E., Meinkoth, J. L., Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1996). Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2936-40.

- Fritz, C. C., Zapp, M. L. & Green, M. R. (1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**, 530-3.
- Fritz, C. C. & Green, M. R. (1996). HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr Biol* **6**, 848-54.
- Fuchs, S. M. & Raines, R. T. (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* **43**, 2438-44.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y. & Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* **271**, 20024-8.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. & Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-11.
- Furnes, C., Arnesen, T., Askjaer, P., Kjems, J. & Szilvay, A. M. (2005). HIV-1 Rev oligomerization is not obligatory in the presence of an extra basic domain. *Retrovirology* **2**, 39.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K. & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **276**, 5836-40.
- Futaki, S., Goto, S. & Sugiura, Y. (2003). Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides. *J Mol Recognit* **16**, 260-4.
- Futaki, S. (2006). Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* **84**, 241-9.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. & Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-7.
- Gius, D. R., Ezhevsky, S. A., Becker-Hapak, M., Nagahara, H., Wei, M. C. & Dowdy, S. F. (1999). Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res* **59**, 2577-80.
- Gonzalez, S. A., Affranchino, J. L., Gelderblom, H. R. & Burny, A. (1993). Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* **194**, 548-56.
- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5781-5.
- Gottwein, E. & Krausslich, H. G. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol* **79**, 9134-44.
- Graham, G. J. & Maio, J. J. (1990). RNA transcripts of the human immunodeficiency virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5817-21.
- Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J. L. & Muriaux, D. (2006). Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* **359**, 848-62.
- Guatelli, J. C., Gingeras, T. R. & Richman, D. D. (1990). Alternative splice acceptor utilization during human immunodeficiency virus type 1 infection of cultured cells. *J Virol* **64**, 4093-8.

- Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A. & Pavlakis, G. N. (1989). The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J Virol* **63**, 1265-74.
- Haglund, K. & Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* **24**, 3353-9.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-14.
- Hakansson, S., Jacobs, A. & Caffrey, M. (2001). Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. *Protein Sci* **10**, 2138-9.
- Hakata, Y., Yamada, M., Mabuchi, N. & Shida, H. (2002). The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions. *J Virol* **76**, 8079-89.
- Hamasaki, K. & Ueno, A. (2001). Aminoglycoside antibiotics, neamine and its derivatives as potent inhibitors for the RNA-protein interactions derived from HIV-1 activators. *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 591-4.
- Hanauske-Abel, H. M., Slowinska, B., Zagulska, S., Wilson, R. C., Staiano-Coico, L., Hanauske, A. R., McCaffrey, T. & Szabo, P. (1995). Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine formation at the G1-S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication. *FEBS Lett* **366**, 92-8.
- Hannon, G. J. & Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371-8.
- Hauber, J., Bouvier, M., Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1988). Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **62**, 4801-4.
- Hauber, I., Bevec, D., Heukeshoven, J., Kratzer, F., Horn, F., Choidas, A., Harrer, T. & Hauber, J. (2005). Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **115**, 76-85.
- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. & Skinner, M. A. (1990). HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685-93.
- Heaphy, S., Finch, J. T., Gait, M. J., Karn, J. & Singh, M. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7366-70.
- Henderson, B. R. & Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* **274**, 693-707.
- Henderson, L. E., Sowder, R. C., Copeland, T. D., Oroszlan, S. & Benveniste, R. E. (1990). Gag precursors of HIV and SIV are cleaved into six proteins found in the mature virions. *J Med Primatol* **19**, 411-9.
- Herrmann, C. H. & Rice, A. P. (1993). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* **197**, 601-8.
- Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **21**, 445-9.
- Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnolzer, M. & Ott, M. (2005). Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect* **7**, 1364-9.
- Hicke, L. & Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-87.
- Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527-30.

- Ho, A., Schwarze, S. R., Mermelstein, S. J., Waksman, G. & Dowdy, S. F. (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res* **61**, 474-7.
- Hochstrasser, M. (2000). Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science* **289**, 563-4.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J. & Dabauvalle, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* **152**, 895-910.
- Hondred, D., Walker, J. M., Mathews, D. E. & Vierstra, R. D. (1999). Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. *Plant Physiol* **119**, 713-24.
- Hope, T. J., McDonald, D., Huang, X. J., Low, J. & Parslow, T. G. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J Virol* **64**, 5360-6.
- Hope, T. J., Bond, B. L., McDonald, D., Klein, N. P. & Parslow, T. G. (1991). Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif. *J Virol* **65**, 6001-7.
- Hope, T. J., Klein, N. P., Elder, M. E. & Parslow, T. G. (1992). trans-dominant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev occurs through formation of inactive protein complexes. *J Virol* **66**, 1849-55.
- Hope, T. J. (1997). Viral RNA export. *Chem Biol* **4**, 335-44.
- Howcroft, T. K., Strebel, K., Martin, M. A. & Singer, D. S. (1993). Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* **260**, 1320-2.
- Hsu, K., Seharaseyon, J., Dong, P., Bour, S. & Marban, E. (2004). Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell* **14**, 259-67.
- Hurt, E. C. (1996). Importins/karyopherins meet nucleoporins. *Cell* **84**, 509-15.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Gorlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**, 6535-47.
- Jacque, J. M., Triques, K. & Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**, 435-8.
- Jain, C. & Belasco, J. G. (2001). Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Mol Cell* **7**, 603-14.
- Janvier, K., Craig, H., Hitchin, D., Madrid, R., Sol-Foulon, N., Renault, L., Cherfils, J., Cassel, D., Benichou, S. & Guatelli, J. (2003). HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. *J Biol Chem* **278**, 8725-32.
- Jeang, K. T., Xiao, H. & Rich, E. A. (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* **274**, 28837-40.
- Jin, L. H., Bahn, J. H., Eum, W. S., Kwon, H. Y., Jang, S. H., Han, K. H., Kang, T. C., Won, M. H., Kang, J. H., Cho, S. W., Park, J. & Choi, S. Y. (2001). Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **31**, 1509-19.
- Jin, Y. & Cowan, J. A. (2006). Targeted cleavage of HIV rev response element RNA by metallopeptide complexes. *J Am Chem Soc* **128**, 410-1.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Jones, K. A. & Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, 717-43.

- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Langhoff, E. & Haukenes, G. (1994). Subcellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J Virol* **68**, 1475-85.
- Kang, H. A. & Hershey, J. W. (1994). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 3934-40.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. & Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* **63**, 3708-13.
- King, J. E., Eugenin, E. A., Buckner, C. M. & Berman, J. W. (2006). HIV tat and neurotoxicity. *Microbes Infect* **8**, 1347-57.
- Kiss, A., Li, L., Gettemeier, T. & Venkatesh, L. K. (2003). Functional analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev nuclear export signal with its cofactors. *Virology* **314**, 591-600.
- Kjems, J., Brown, M., Chang, D. D. & Sharp, P. A. (1991). Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 683-7.
- Kjems, J. & Sharp, P. A. (1993). The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J Virol* **67**, 4769-76.
- Knight, D. M., Flomerfelt, F. A. & Ghrayeb, J. (1987). Expression of the art/trs protein of HIV and study of its role in viral envelope synthesis. *Science* **236**, 837-40.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K. & Uchiyama, T. (2005). Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* **280**, 18573-8.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. & Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in mutliubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-44.
- Kramer-Hammerle, S., Ceccherini-Silberstein, F., Bickel, C., Wolff, H., Vincendeau, M., Werner, T., Erfle, V. & Brack-Werner, R. (2005). Identification of a novel Rev-interacting cellular protein. *BMC Cell Biol* **6**, 20.
- Kubota, S. & Pomerantz, R. J. (1998). A cis-acting peptide signal in human immunodeficiency virus type I Rev which inhibits nuclear entry of small proteins. *Oncogene* **16**, 1851-61.
- Kurosu, T. & Peterlin, B. M. (2004). VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Curr Biol* **14**, 1112-6.
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R. B. & Bex, F. (2005). Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* **25**, 10391-406.
- Landles, C. & Bates, G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* **5**, 958-63.
- Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. & Capon, D. J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**, 975-85.

- Leavitt, A. D., Rose, R. B. & Varmus, H. E. (1992). Both substrate and target oligonucleotide sequences affect in vitro integration mediated by human immunodeficiency virus type 1 integrase protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* **66**, 2359-68.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. & Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**, 1112.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P. & Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**, 500-5.
- Lee, S. W., Gallardo, H. F., Gilboa, E. & Smith, C. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in human T cells by a potent Rev response element decoy consisting of the 13-nucleotide minimal Rev-binding domain. *J Virol* **68**, 8254-64.
- Lee, S. W., Gallardo, H. F., Gaspar, O., Smith, C. & Gilboa, E. (1995). Inhibition of HIV-1 in CEM cells by a potent TAR decoy. *Gene Ther* **2**, 377-84.
- Lee, Y. W., Hirani, A. A., Kyprianou, N. & Toborek, M. (2005). Human immunodeficiency virus-1 Tat protein up-regulates interleukin-6 and interleukin-8 expression in human breast cancer cells. *Inflamm Res* **54**, 380-9.
- Lener, D., Tanchou, V., Roques, B. P., Le Grice, S. F. & Darlix, J. L. (1998). Involvement of HIV-I nucleocapsid protein in the recruitment of reverse transcriptase into nucleoprotein complexes formed in vitro. *J Biol Chem* **273**, 33781-6.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Kurilla, M. G. & Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Nature* **375**, 685-688.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. & Pardee, A. B. (1995a). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**, 429-31.
- Li, C. J., Wang, C., Friedman, D. J. & Pardee, A. B. (1995b). Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5461-4.
- Li, G., Lisziewicz, J., Sun, D., Zon, G., Daefler, S., Wong-Staal, F., Gallo, R. C. & Klotman, M. E. (1993). Inhibition of Rev activity and human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate analogs directed against the Rev-responsive element. *J Virol* **67**, 6882-8.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B. O. & He, J. J. (2002a). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol* **76**, 8374-82.
- Li, J., Liu, Y., Park, I. W. & He, J. J. (2002b). Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J Virol* **76**, 4526-35.
- Li, L., Li, H. S., Pauza, C. D., Bukrinsky, M. & Zhao, R. Y. (2005). Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* **15**, 923-34.
- Li, S., Hill, C. P., Sundquist, W. I. & Finch, J. T. (2000). Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* **407**, 409-13.
- Li, Y., Wang, H., Wang, S., Quon, D., Liu, Y. W. & Cordell, B. (2003). Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 259-64.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. & Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-77.

- Lori, F., di Marzo Veronese, F., de Vico, A. L., Lusso, P., Reitz, M. S., Jr. & Gallo, R. C. (1992). Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **66**, 5067-74.
- Love, D. C., Sweitzer, T. D. & Hanover, J. A. (1998). Reconstitution of HIV-1 rev nuclear export: independent requirements for nuclear import and export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10608-13.
- Lundberg, M., Wikstrom, S. & Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* **8**, 143-50.
- Luo, Y. & Peterlin, B. M. (1993). Juxtaposition between activation and basic domains of human immunodeficiency virus type 1 Tat is required for optimal interactions between Tat and TAR. *J Virol* **67**, 3441-5.
- Madore, S. J., Tiley, L. S., Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1994). Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. *Virology* **202**, 186-94.
- Mai, J. C., Shen, H., Watkins, S. C., Cheng, T. & Robbins, P. D. (2002). Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* **277**, 30208-18.
- Malim, M. H., Hauber, J., Fenrick, R. & Cullen, B. R. (1988). Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**, 181-3.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. (1989a). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-7.
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J. & Cullen, B. R. (1989b). Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**, 205-14.
- Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J. & Cullen, B. R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**, 675-83.
- Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S. & Cullen, B. R. (1991). Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* **65**, 4248-54.
- Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1991). HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241-8.
- Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1993). Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **13**, 6180-9.
- Marcello, A., Zoppe, M. & Giacca, M. (2001). Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* **51**, 175-81.
- Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. & Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**, 565-74.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**, 1313-9.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. & Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-70.

- McDonald, D., Hope, T. J. & Parslow, T. G. (1992). Posttranscriptional regulation by the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex proteins through a heterologous RNA binding site. *J Virol* **66**, 7232-8.
- McMillan, N. A., Chun, R. F., Siderovski, D. P., Galabru, J., Toone, W. M., Samuel, C. E., Mak, T. W., Hovanessian, A. G., Jeang, K. T. & Williams, B. R. (1995). HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* **213**, 413-24.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. & Matzke A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* **19**, 5194-5201.
- Meyer, B. E., Meinkoth, J. L. & Malim, M. H. (1996). Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J Virol* **70**, 2350-9.
- Mhashilkar, A. M., Bagley, J., Chen, S. Y., Szilvay, A. M., Helland, D. G. & Marasco, W. A. (1995). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *Embo J* **14**, 1542-51.
- Michienzi, A., Conti, L., Varano, B., Prislei, S., Gessani, S. & Bozzoni, I. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line. *Hum Gene Ther* **9**, 621-8.
- Michienzi, A., Cagnon, L., Bahner, I. & Rossi, J. J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8955-60.
- Michienzi, A., Li, S., Zaia, J. A. & Rossi, J. J. (2002). A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14047-52.
- Michienzi, A., De Angelis, F. G., Bozzoni, I. & Rossi, J. J. (2006). A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Res Ther* **3**, 13.
- Modem, S., Badri, K. R., Holland, T. C. & Reddy, T. R. (2005). Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Res* **33**, 873-9.
- Modesti, N., Garcia, J., Debouck, C., Peterlin, M. & Gaynor, R. (1991). Trans-dominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. *New Biol* **3**, 759-68.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J. E., Ott, M., Verdin, E. & Zhou, M. M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell* **9**, 575-86.
- Muller, S., Matunis, M. J. & Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* **17**, 61-70.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y. & Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**, 13321-9.
- Muratani, M. & Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201.
- Muriaux, D., Darlix, J. L. & Cimarelli, A. (2004). Targeting the assembly of the human immunodeficiency virus type I. *Curr Pharm Des* **10**, 3725-39.
- Musti, A. M., Treier, M. & Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**, 400-2.
- Najib, S., Martin-Romero, C., Gonzalez-Yanes, C. & Sanchez-Margalet, V. (2005). Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **62**, 36-43.

- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y. & Futaki, S. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther* **10**, 1011-22.
- Nardelli, B., Gonzalez, C. J., Schechter, M. & Valentine, F. T. (1995). CD4+ blood lymphocytes are rapidly killed in vitro by contact with autologous human immunodeficiency virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7312-6.
- Nasr, R., Chiari, E., El-Sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., de The, H., Pique, C. & Bazarbachi, A. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* **107**, 4021-9.
- Negrone, M. & Buc, H. (2001). Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet* **35**, 275-302.
- Neuveut, C. & Jeang, K. T. (1996). Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol* **70**, 5572-81.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I. & Rosbash, M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**, 767-75.
- Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J. & Hildreth, J. E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**, 52347-54.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1994). Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem* **269**, 6320-4.
- Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S. J. & Darlix, J. L. (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol* **318**, 9-20.
- Olsen, H. S., Nelbock, P., Cochrane, A. W. & Rosen, C. A. (1990). Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA. *Science* **247**, 845-8.
- ONUSIDA and OMS (2006). Rapport sur l'épidémie globale de SIDA, mai 2006. www.unaids.org .
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. & Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278**, 141-4.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E. (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **72**, 2962-8.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Sowder, R. C., 2nd, Adams, J. & Schubert, U. (2003). Retroviruses have differing requirements for proteasome function in the budding process. *J Virol* **77**, 3384-93.
- Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S. & Verdin, E. (1997). Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* **275**, 1481-5.
- Park, M. H. (1989). The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* **264**, 18531-5.

- Park, J., Ryu, J., Kim, K. A., Lee, H. J., Bahn, J. H., Han, K., Choi, E. Y., Lee, K. S., Kwon, H. Y. & Choi, S. Y. (2002). Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol* **83**, 1173-81.
- Paxton, W., Connor, R. I. & Landau, N. R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* **67**, 7229-37.
- Peloponese, J. M., Jr., Iha, H., Yedavalli, V. R., Miyazato, A., Li, Y., Haller, K., Benkirane, M. & Jeang, K. T. (2004). Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* **78**, 11686-95.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. & Gygi, S. P. (2003). A proteomic approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotech* **21**, 921-6.
- Perales, C., Carrasco, L. & Gonzalez, M. E. (2005). Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochim Biophys Acta* **1743**, 169-75.
- Perez, L. G., O'Donnell, M. A. & Stephens, E. B. (1992). The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J Virol* **66**, 4134-43.
- Pickart, C. M. & Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains : polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-6.
- Piguet, V. & Blauvelt, A. (2002). Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* **119**, 365-9.
- Pollard, V. W. & Malim, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Pongoski, J., Asai, K. & Cochrane, A. (2002). Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral RNA splicing. *J Virol* **76**, 5108-20.
- Powell, D. M., Amaral, M. C., Wu, J. Y., Maniatis, T. & Greene, W. C. (1997). HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 973-8.
- Pumfery, A., de la Fuente, C., Berro, R., Nekhai, S., Kashanchi, F. & Chao, S. H. (2006). Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics. *Curr Pharm Des* **12**, 1949-61.
- Raha, T., Cheng, S. W. & Green, M. R. (2005). HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. *PLoS Biol* **3**, e44.
- Rana, T. M. & Jeang, K. T. (1999). Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* **365**, 175-85.
- Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S. A. & Wilson, V. G. (2000). SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* **275**, 37999-8004.
- Ravikumar, B. & Rubinsztein, D. C. (2006). Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin : a step toward therapy ? *Mol Asp Med* **27**, 520-7.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-71.
- Reddy, T. R., Xu, W., Mau, J. K., Goodwin, C. D., Suhasini, M., Tang, H., Frimpong, K., Rose, D. W. & Wong-Staal, F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med* **5**, 635-42.
- Reza, S. M., Shen, L. M., Mukhopadhyay, R., Rosetti, M., Pe'ery, T. & Mathews, M. B. (2003). A naturally occurring substitution in human immunodeficiency virus Tat increases expression of the viral genome. *J Virol* **77**, 8602-6.

- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. & Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**, 585-90.
- Riordan, J. R. (2005). Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* **67**, 701-18.
- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T. & Goldberg, A. L. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* **80**, 1-70.
- Roisin, A., Robin, J. P., Dereuddre-Bosquet, N., Vitte, A. L., Dormont, D., Clayette, P. & Jalinot, P. (2004). Inhibition of HIV-1 replication by cell-penetrating peptides binding Rev. *J Biol Chem* **279**, 9208-14.
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A. & Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1 specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447-50.
- Rosorius, O., Reichart, B., Kratzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M. C. & Hauber, J. (1999). Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* **112** (Pt 14), 2369-80.
- Rout, M. P. & Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**, 771-83.
- Rout, M. P., Blobel, G. & Aitchison, J. D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**, 715-25.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W. A. & Rosen, C. A. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* **63**, 1-8.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D. & et al. (1993). Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* **123**, 1309-20.
- Sanchez-Velar, N., Udofia, E. B., Yu, Z. & Zapp, M. L. (2004). hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev* **18**, 23-34.
- Santa-Marta, M., da Silva, F. A., Fonseca, A. M. & Goncalves, J. (2005). HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J Biol Chem* **280**, 8765-75.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-36.
- Schlesinger, D. H., Goldstein, G. & Niall, H. D. (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* **14**, 2214-8.
- Schmidtmayerova, H., Nottet, H. S., Nuovo, G., Raabe, T., Flanagan, C. R., Dubrovsky, L., Gendelman, H. E., Cerami, A., Bukrinsky, M. & Sherry, B. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 700-4.
- Schwarze, S. R. & Dowdy, S. F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 45-8.
- Schwarze, S. R., Hruska, K. A. & Dowdy, S. F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* **10**, 290-5.

- Seeler, J. S. & Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* **20**, 7243-9.
- Sherman, M. P., de Noronha, C. M., Eckstein, L. A., Hataye, J., Mundt, P., Williams, S. A., Neidleman, J. A., Goldsmith, M. A. & Greene, W. C. (2003). Nuclear export of Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages. *J Virol* **77**, 7582-9.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834-839.
- Smit-McBride, Z., Schnier, J., Kaufman, R. J. & Hershey, J. W. (1989). Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyphusinated forms of the protein. *J Biol Chem* **264**, 18527-30.
- Soros, V. B., Carvajal, H. V., Richard, S. & Cochrane, A. W. (2001). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *J Virol* **75**, 8203-15.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. & Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-50.
- Staffa, A. & Cochrane, A. (1995). Identification of positive and negative splicing regulatory elements within the terminal tat-rev exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* **15**, 4597-605.
- Staub, O. & Rotin, D. (2006). Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* **86**, 669-707.
- Stauber, R., Gaitanaris, G. A. & Pavlakis, G. N. (1995). Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology* **213**, 439-49.
- Stauber, R. H. & Pavlakis, G. N. (1998). Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* **252**, 126-136.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G. & Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**, 229-34.
- Strack, P. R., Frey, M. W., Rizzo, C. J., Cordova, B., George, H. J., Meade, R., Ho, S. P., Corman, J., Tritch, R. & Korant, B. D. (1996). Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9571-6.
- Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G. & Rout, M. P. (1999). Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol* **144**, 839-55.
- Stutz, F., Neville, M. & Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* **82**, 495-506.
- Stutz, F. & Rosbash, M. (1998). Nuclear RNA export. *Genes Dev* **12**, 3303-19.
- Subramanian, T., Kuppaswamy, M., Venkatesh, L., Srinivasan, A. & Chinnadurai, G. (1990). Functional substitution of the basic domain of the HIV-1 trans-activator, Tat, with the basic domain of the functionally heterologous Rev. *Virology* **176**, 178-83.
- Sun, L. & Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 119-26.
- Surabhi, R. M. & Gaynor, R. B. (2002). RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* **76**, 12963-73.
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K. & Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem* **277**, 2437-43.

- Szebeni, A., Mehrotra, B., Baumann, A., Adam, S. A., Wingfield, P. T. & Olson, M. O. (1997). Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* **36**, 3941-9.
- Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Kopperud, R., Haukenes, G. & Kalland, K. H. (1995). Nuclear export of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocytoplasmic shuttle protein Rev is mediated by its activation domain and is blocked by transdominant negative mutants. *J Virol* **69**, 3315-23.
- Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Boe, S. O., Haukenes, G. & Kalland, K. H. (1997). Oligomerization of HIV-1 Rev mutants in the cytoplasm and during nuclear import. *Virology* **235**, 73-81.
- Szilvay, A. M., Boe, S. O. & Kalland, K. H. (1999). Co-expression of a trans-dominant negative mutant of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein affects the Rev-dependent splicing pattern and expression of HIV-1 RNAs. *J Gen Virol* **80**, 1965-74.
- Taylor, S. J., Resnick, R. J. & Shalloway, D. (2004). Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC Cell Biol* **5**, 5.
- Terwilliger, E., Burghoff, R., Sia, R., Sodroski, J., Haseltine, W. & Rosen, C. (1988). The art gene product of human immunodeficiency virus is required for replication. *J Virol* **62**, 655-8.
- Theisen, D. M., Pongratz, C., Wiegmann, K., Rivero, F., Krut, O. & Kronke, M. (2006). Targeting of HIV-1 Tat traffic and function by transduction-competent single chain antibodies. *Vaccine* **24**, 3127-36.
- Thoren, P. E., Persson, D., Isakson, P., Goksor, M., Onfelt, A. & Norden, B. (2003). Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 100-7.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Trikha, R. & Brighty, D. W. (2005). Phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Rev trimerization-interface mutants in human cells. *J Gen Virol* **86**, 1509-13.
- Trinh, D. P., Brown, K. M. & Jeang, K. T. (1999). Epithelin/granulin growth factors: extracellular cofactors for HIV-1 and HIV-2 Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 299-306.
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Mangeat, B., Klages, N., Evans, R., Kalpana, G. & Trono, D. (2001). Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell* **7**, 1245-54.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. & Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **276**, 3254-61.
- Ullman, K. S., Powers, M. A. & Forbes, D. J. (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**, 967-70.
- Ullman, K. S., Shah, S., Powers, M. A. & Forbes, D. J. (1999). The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. *Mol Biol Cell* **10**, 649-64.
- Unwalla, H., Chakraborti, S., Sood, V., Gupta, N. & Banerjee, A. C. (2006). Potent inhibition of HIV-1 gene expression and TAT-mediated apoptosis in human T cells by novel mono- and multitarget anti-TAT/Rev/Env ribozymes and a general purpose RNA-cleaving DNA-enzyme. *Antiviral Res* **72**, 134-44.
- Van der Wal, F. J., Kikkert, M. & Wiertz, E. (2002). The HCMV gene products US2 and US11 target MHC class I molecules for degradation in the cytosol. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 37-55.
- Van Maele, B. & Debyser, Z. (2005). HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* **7**, 26-43.

- Van Ryk, D. I. & Venkatesan, S. (1999). Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis. *J Biol Chem* **274**, 17452-63.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C. & Fushman, D. (2004) Solution conformation of Lys⁶³-linked di-ubiquitin chain provides clues for functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* **279**, 7055-63.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12142-9.
- Varshavsky, A. (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**, 383-7.
- Venkatesan, S., Gerstberger, S. M., Park, H., Holland, S. M. & Nam, Y. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Rev activation can be achieved without Rev-responsive element RNA if Rev is directed to the target as a Rev/MS2 fusion protein which tethers the MS2 operator RNA. *J Virol* **66**, 7469-80.
- Venkatesh, L. K., Gettemeier, T. & Chinnadurai, G. (2003). A nuclear kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *J Virol* **77**, 7236-43.
- Vives, E. (2003). Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J Mol Recognit* **16**, 265-71.
- Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V., Lissy, N. A., Ratner, L. & Dowdy, S. F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* **5**, 29-33.
- Wadia, J. S., Stan, R. V. & Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* **10**, 310-5.
- Wang, H. Y., Fu, T., Wang, G., Zeng, G., Perry-Lalley, D. M., Yang, J. C., Restifo, N. P., Hwu, P. & Wang, R. F. (2002). Induction of CD4(+) T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest* **109**, 1463-70.
- Wang, J. K., Kiyokawa, E., Verdin, E. & Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 394-9.
- Watts, N. R., Sackett, D. L., Ward, R. D., Miller, M. W., Wingfield, P. T., Stahl, S. S. & Steven, A. C. (2000). HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J Cell Biol* **150**, 349-60.
- Weichselbraun, I., Farrington, G. K., Rusche, J. R., Bohnlein, E. & Hauber, J. (1992). Definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex protein activation domain by functional exchange. *J Virol* **66**, 2583-7.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. & Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-73.
- Wenzel, T. & Baumeister, W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol* **2**, 199-204.
- Westendorp, M. O., Shatrov, V. A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P. H., Droge, W. & Lehmann, V. (1995). HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo J* **14**, 546-54.
- Woffendin, C., Ranga, U., Yang, Z., Xu, L. & Nabel, G. J. (1996). Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2889-94.

- Wojcik, C. (2001). Ubiquitin--more than just a signal for protein degradation. *Trends Cell Biol* **11**, 397-9.
- Wojcik, C. & DeMartino, G. N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 579-89.
- Wong, B. R., Parlati, F., Qu, K., Demo, S., Pray, T., Huang, J., Payan, D. G. & Bennett, M. K. (2003). Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today* **8**, 746-54.
- Wu-Baer, F., Lagrazon, K., Yuan, W. & Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* **278**, 34743-6.
- Yang, X., Herrmann, C. H. & Rice, A. P. (1996). The human immunodeficiency virus Tat proteins specifically associate with TAK in vivo and require the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II for function. *J Virol* **70**, 4576-84.
- Yang, Y., Tikhonov, I., Ruckwardt, T. J., Djavani, M., Zapata, J. C., Pauza, C. D. & Salvato, M. S. (2003). Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *J Virol* **77**, 6700-8.
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L. & Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**, 381-92.
- Yu, Z., Sanchez-Velar, N., Catrina, I. E., Kittler, E. L., Udofia, E. B. & Zapp, M. L. (2005). The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4027-32.
- Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G. & Green, M. R. (1991). Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7734-8.
- Zapp, M. L., Stern, S. & Green, M. R. (1993). Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell* **74**, 969-78.
- Zapp, M. L., Young, D. W., Kumar, A., Singh, R., Boykin, D. W., Wilson, W. D. & Green, M. R. (1997). Modulation of the Rev-RRE interaction by aromatic heterocyclic compounds. *Bioorg Med Chem* **5**, 1149-55.
- Zhang, W. H., Hockley, D. J., Nermut, M. V., Morikawa, Y. & Jones, I. M. (1996). Gag-Gag interactions in the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 p24 capsid antigen are essential for Gag particle assembly. *J Gen Virol* **77**, 743-51.
- Zheng, Y. H., Plemenitas, A., Fielding, C. J. & Peterlin, B. M. (2003a). Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8460-5.
- Zheng, Y. H., Yu, H. F. & Peterlin, B. M. (2003b). Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells. *Nat Cell Biol* **5**, 611-8.
- Zhou, B. Y., Liu, Y., Kim, B., Kiao, Y. & He, J. (2004). Astrocyte activation and dysfunction and neuron death by HIV-1 Tat expression in astrocytes. *Mol Cell NeuroSci* **27**, 296-305.
- Zhou, Q. & Sharp, P. A. (1995). Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *Embo J* **14**, 321-8.
- Zolotukhin, A. S. & Felber, B. K. (1999). Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* **73**, 120-7.