

## **Virus HTLV-I: structure et fonction des protéines de la région pX**

Comme les autres rétrovirus, le virus HTLV-I possède les gènes *gag*, *pol* et *env*, qui codent pour les protéines de structure : protéase, transcriptase inverse, glycoprotéines transmembranaires et de surface. Ce virus possède, en outre, une région particulière, située en 3' du gène *env*, qui joue un rôle majeur dans la leucémogénèse et la régulation de l'expression virale. Cette région, pX, est transcrite en codant pour un ARN messenger doublement épissé de 2,1 kb trois protéines : p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup> et p21<sup>Rex</sup>. La p40<sup>Tax</sup> est une phosphoprotéine nucléaire qui a un effet positif sur la réplication virale et transactive de nombreux gènes cellulaires. La p27<sup>Rex</sup> est une phosphoprotéine nucléolaire qui participe à la régulation de l'expression virale au niveau post-transcriptionnel. Le rôle de la protéine p21<sup>Rex</sup> demeure inconnu. Plusieurs équipes ont récemment mis en évidence de nouveaux ARN messagers de la région pX qui codent pour des protéines de 12, 13 et 30 kDa, localisées respectivement dans le cytoplasme, le noyau et le nucléole. Ainsi, le virus HTLV-I, tout comme le VIH, a-t-il su augmenter la complexité de son génome par des mécanismes d'épissage alternatif ? Ces protéines sont peut-être en cause dans les maladies associées au virus HTLV-I.

---

**Igor J. Koralnik**  
**Antoine Gessain**

---

### ADRESSES

I. J. Koralnik : *médecin assistant*. Neurology department, Brigham and Women's Hospital, 75 Francis St., Boston, MA 02115, USA.

A. Gessain : *ancien interne des hôpitaux de Paris, docteur ès sciences, chargé de recherche à l'Institut Pasteur*. Laboratoire d'épidémiologie des virus oncogènes, département des rétrovirus, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

**L**e virus HTLV-I, premier oncorétrovirus humain, découvert en 1980 [1], est fortement endémique au Japon, dans la région Caraïbe, l'Afrique intertropicale et certaines régions d'Amérique du Sud et de Mélanésie. On estime à 15/20 millions le nombre de sujets infectés dans le monde. Il est transmis lors de l'allaitement, mais également par contact sexuel ou trans-fusion de cellules infectées. Ce virus

est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (*adult T-cell leukemia/lymphoma*, ATL) [2], ainsi que d'une neuromyélopathie chronique, la paraparésie spastique tropicale (*tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy*) [3]. Cette mise au point décrit les mécanismes régulateurs de l'expression du virus HTLV-I, ainsi que la découverte récente de nouvelles protéines virales codées par la région pX du

génomique du virus, et discute différentes hypothèses physiopathologiques concernant les maladies associées.

## Organisation génétique et régulation de l'expression virale

L'organisation génétique d'HTLV-I [4] (figure 1), comme celle des autres rétrovirus animaux, comporte les gènes codant pour les protéines

de structure interne (core; antigène de groupe, Gag), la transcriptase inverse (Pol), la protéase, et les protéines d'enveloppe (Env), encadrées par deux parties terminales répétées (*long terminal repeat*, LTR) qui contiennent des éléments régulateurs. En outre, il possède une région particulière de près de 2 kb située immédiatement en amont du LTR 3', dénommée initialement pX en raison de sa nature inconnue. Cette

région contient au moins quatre cadres ouverts de lecture (*open reading frames* ou ORF). L'ORF IV code pour la protéine transactivatrice p40<sup>Tax</sup>, et l'ORF III pour la protéine p27<sup>Rex</sup>, régulatrice post-transcriptionnelle de l'expression virale ainsi que pour la protéine p21<sup>Rex</sup> dont la fonction demeure inconnue. Ces protéines sont synthétisées grâce au même ARN messager polycistronique, doublement épissé,

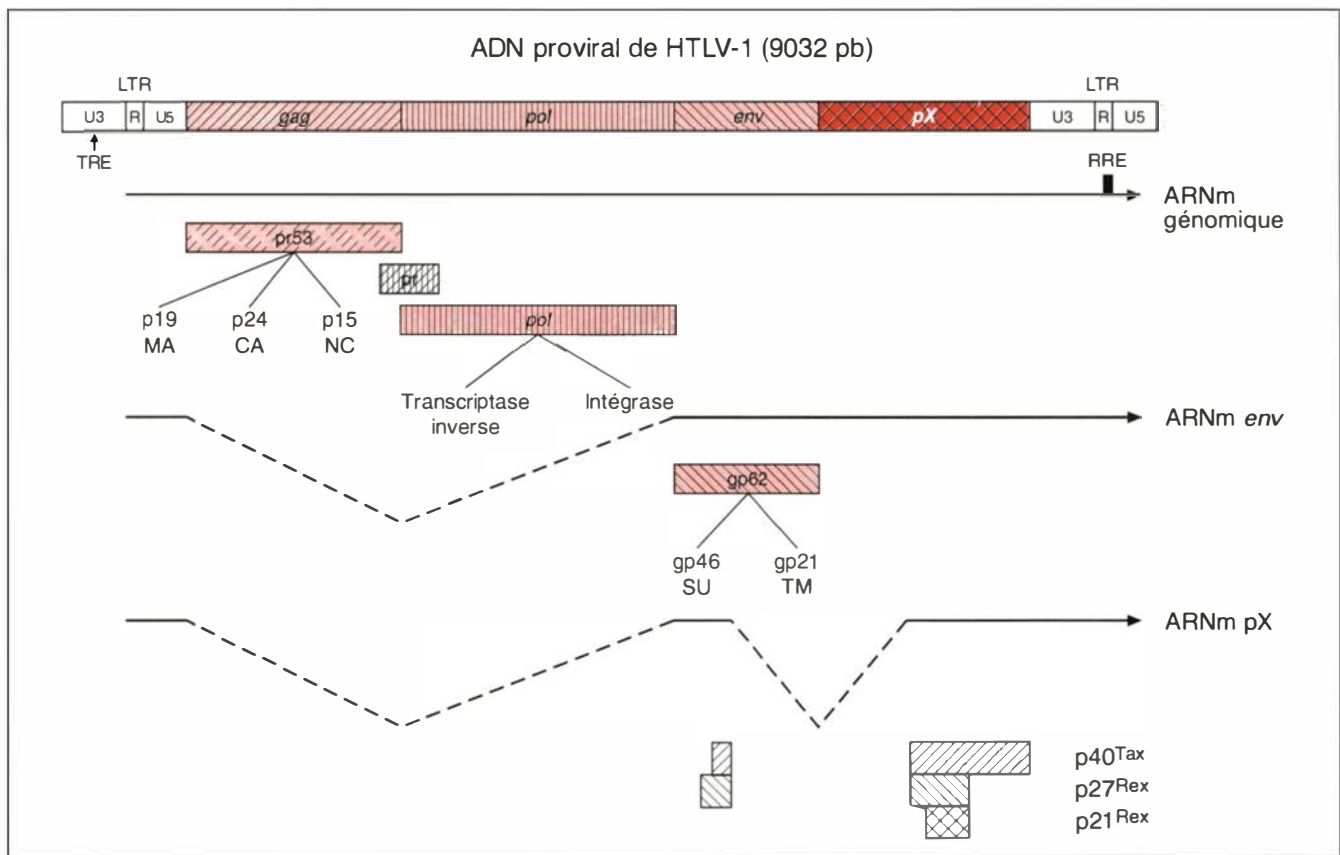
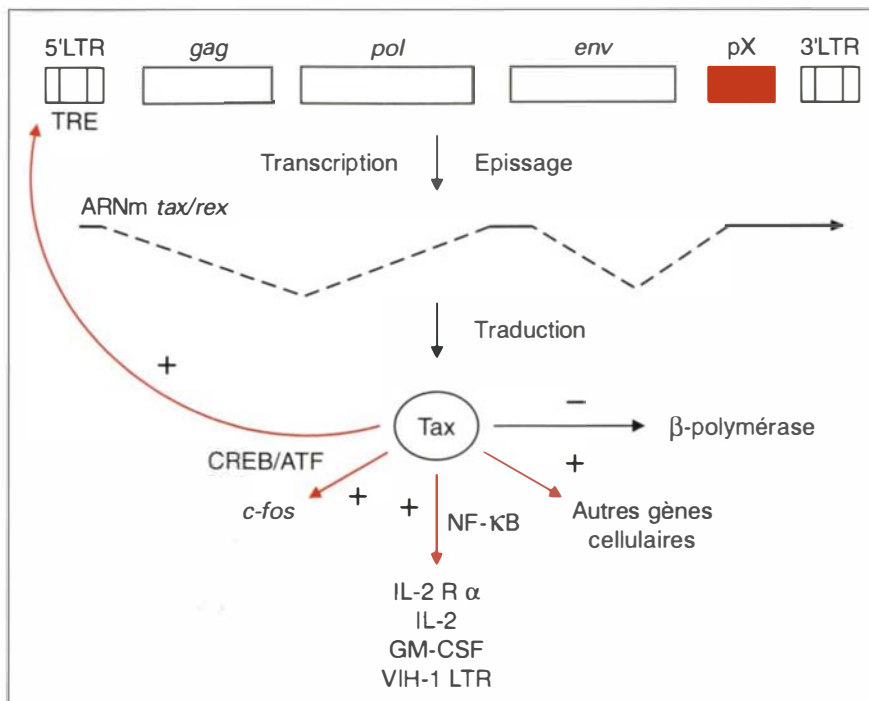


Figure 1. **Organisation génétique de l'HTLV-I.** La région gag est initialement traduite en une protéine précurseur (pr 53) qui est par la suite clivée pour donner les trois protéines de structure que sont la protéine de la matrice (Ma) ou p19 (130 acides aminés), la protéine de la capside (Ca) ou p24 (214 acides aminés), et la protéine de la nucléocapside (Nc) ou p15 (85 acides aminés). La protéase (Pr) est codée par un cadre ouvert de lecture situé à cheval entre la partie 3' de la région gag et la partie 5' de la région pol. La région pol code pour une protéine de 896 acides aminés comprenant la transcriptase inverse et l'intégrase. Le produit de la traduction du cadre ouvert de lecture pour la région env est une protéine glycosylée de 61 à 69 kDa dépendant de la lignée étudiée. Cette protéine est clivée en deux protéines, la gp46 de surface (Su) (312 acides aminés) et la gp21 transmembranaire (TM) (176 acides aminés). Trois principaux ARN messagers ont été identifiés pour le virus HTLV-I. Il existe un ARN complet qui est transcrit à partir de la jonction U3R dans le LTR 5' et qui se termine à la jonction RU5 dans le LTR 3'. Le transcrit est utilisé pour la synthèse des produits de la région gag-pol et est aussi utilisé comme l'ARN génomique inclus dans le virion. Un ARNm subgénomique, dans lequel un intron est éliminé, est utilisé pour la génération du produit de la région env. Un second ARNm subgénomique, dans lequel deux introns sont éliminés, code pour les protéines p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup> et p21<sup>Rex</sup>. TRE (Tax responsive element) : séquences, présentes dans le LTR 5', impliquées dans l'activation de la transcription relayée par la protéine Tax. RRE : (Rex responsive element) : site de liaison de la protéine Rex, présent dans le LTR 3'.

## RÉFÉRENCES

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn AP, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-9.
- Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2534-7.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2: 407-10.
- Smith MR, Greene CW. Molecular biology of the type I human T-cell leukemia virus (HTLV-I) and adult T-cell leukemia. *J Clin Invest* 1991; 87: 761-6.
- Sodroski J, Rosen C, Goh WC, Haseltine W. A transcriptional activator protein encoded by the x-lor region of the human T-cell leukemia virus. *Science* 1985; 228: 1430-4.
- Jeang KT, Boros I, Brady J, Radonovitch M, Khoury G. Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type 1 p40x-responsive 21-base pair sequence. *J Virol* 1988; 62: 4499-509.
- Fuji M, Sassone-Corsi P, Verma M. c-fos promoter transactivation by the tax protein of human T-cell leukemia virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8526-30.
- Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J* 1986; 5: 2883-8.



**Figure 2. Activation de la transcription de gènes viraux et cellulaires par Tax.** La protéine Tax, codée par la région pX du provirus HTLV-I, est traduite à partir d'un ARNm doublement épissé. Tax transactive le LTR d'HTLV-I et le proto-oncogène c-fos en modifiant les facteurs de transcription CREB/ATF, qui se lient au LTR d'HTLV-I et au promoteur de c-fos. Par un mécanisme distinct, Tax induit l'expression nucléaire du facteur de transcription NF-κB et active la transcription de promoteurs viraux et cellulaires contenant le NF-κB enhancer element. La liste des autres gènes cellulaires activés par Tax comprend c-sis, c-jun, les gènes codant pour le nerve growth factor [11], l'IL 6, le tumor necrosis factor β, le transforming growth factor β, le gène de la globine, et celui de la vimentine. En revanche, Tax diminue l'expression de la β-polymérase, une enzyme cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN.

de 2,1 kb. Tax et Rex, tout comme les protéines Tat et Rev du VIH-1, jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression virale.

### La protéine Tax : transactivatrice et médiatrice potentielle de la transformation des lymphocytes T

La protéine Tax est une phosphoprotéine nucléaire de 353 acides aminés, d'une masse moléculaire apparente de 40 kDa. Elle est dite transactivatrice [5] car elle augmente la transcription d'HTLV-I en agissant au niveau de l'élément répondant à Tax (*Tax responsive element* (TRE)), localisé dans la portion U3 du LTR 5' (figure 2). Le

TRE est constitué par trois répétitions imparfaites de 21 paires de bases, contenant un octanucléotide central (TGACGTCT) [6]. Cette action indirecte est relayée par des facteurs cellulaires protéiques se liant à l'élément répondant à l'AMPc (*cAMP response element binding protein*, CREB) et aux facteurs activateurs de la transcription (ATF) (figure 2). Ces mêmes facteurs sont impliqués dans l'activation par Tax du proto-oncogène cellulaire *c-fos* [7]. En plus de son propre LTR, Tax peut aussi augmenter l'expression de nombreux promoteurs hétérologues cellulaires par l'intermédiaire du facteur de transcription nucléaire NF-κB tels que ceux de l'interleukine 2 (IL 2), la chaîne α du récepteur de l'IL 2, et le GM-

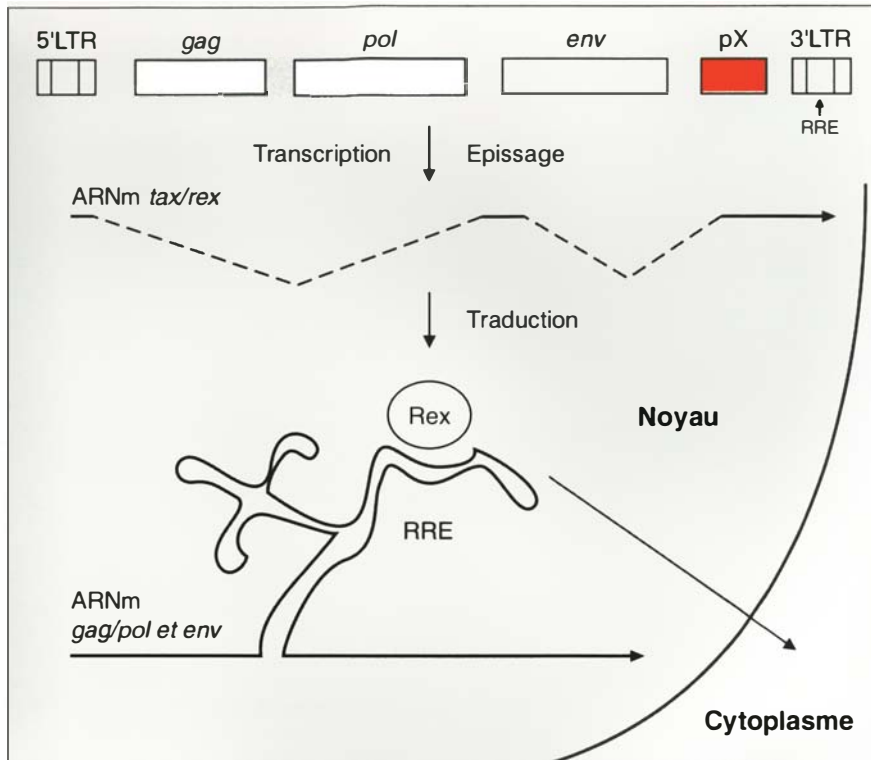


Figure 3. **La protéine Rex agit en se liant à l'ARN viral.** La protéine Rex, codée par la région pX du provirus HTLV-I, est traduite à partir du même ARNm que la protéine Tax. Rex se lie directement dans le noyau aux ARNm viraux, au niveau d'une structure complexe formant de multiples boucles énergétiquement stables, appelée le Rex responsive element (RRE) qui se trouve dans le LTR3'. Bien que le RRE soit présent dans tous les transcrits viraux, Rex favorise spécifiquement le passage dans le cytoplasme des transcrits non ou incomplètement épissés codant pour les protéines Gag/Pol et Env.

CSF [8, 9]. Le rôle central de ces gènes dans la croissance et l'activation normales des lymphocytes T suggère que l'activation de ces unités de transcription représente un mécanisme important contribuant à la transformation cellulaire induite par HTLV-I.

Par ailleurs, Tax est également capable d'activer l'expression du LTR du VIH-1, faisant ainsi preuve d'une analogie fonctionnelle avec la protéine Tat du VIH-1, ce qui pourrait expliquer la production accrue du VIH-1 dans les cellules doublement infectées par les deux virus [10]. La liste d'autres gènes cellulaires activés par Tax ne cesse de s'allonger, et comprend le *c-sis*, *c-jun*, les gènes codant pour le *nerve growth factor* [11], l'IL 6, le *tumor necrosis factor*  $\beta$ ,

le *transforming growth factor*  $\beta$ , le gène de la globine, et celui de la vimentine [12]. Une action sur le promoteur de la *parathyroid hormone-related protein* a également été mise en évidence [13], apportant un élément à la compréhension de l'hypercalcémie fréquente chez les patients atteints de lymphome à cellules T de l'adulte. Finalement, Tax a un rôle répressur sur le gène de l'enzyme  $\beta$ -polymérase, impliquée dans la réparation de l'ADN.

### La protéine Rex : régulatrice de l'expression des gènes structuraux d'HTLV-I

La protéine Rex est une phosphoprotéine nucléolaire de 189 acides

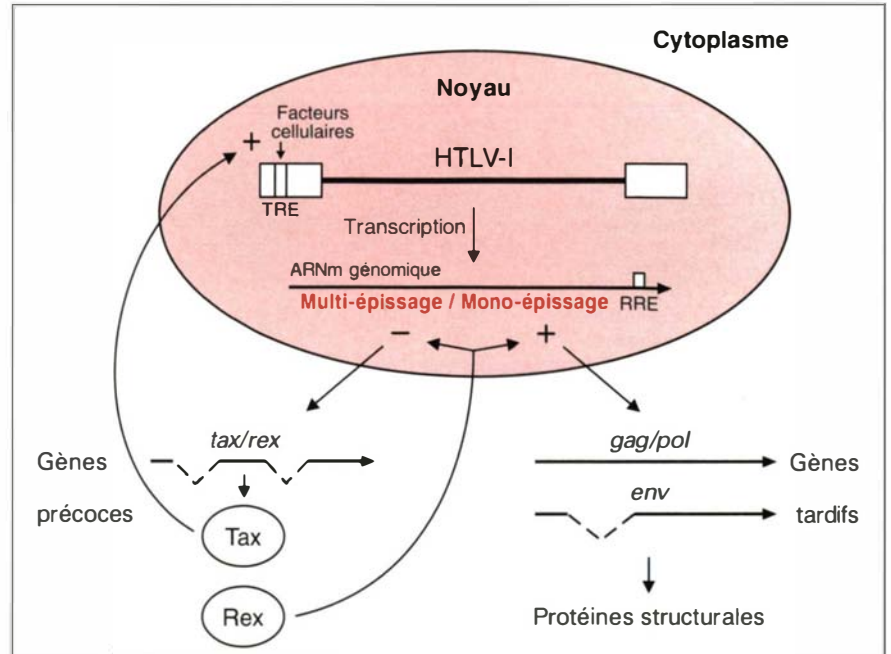
aminés, d'une masse moléculaire apparente de 27 kDa. Contrairement à Tax, Rex n'a pas d'effet sur la transcription, mais agit principalement au niveau post-transcriptionnel pour régler l'expression des gènes viraux [14]. La fonction de Rex est d'augmenter l'expression des protéines virales structurales et enzymatiques, en facilitant le passage dans le cytoplasme des ARNm non ou simplement épissés, qui codent pour les protéines Gag, Pol et Env, favorisant leur traduction [15] (figure 3). En l'absence de Rex, ces ARNm demeurent séquestrés dans le noyau où ils sont, soit complètement épissés, soit dégradés. En augmentant l'expression cytoplasmique de ces ARNm, Rex inhibe ainsi indirectement l'expression des ARNm doublement épissés codant pour les protéines Tax/Rex. Cette régulation négative des gènes *tax* et *rex* par la protéine Rex pourrait avoir des implications importantes dans l'établissement et la maintenance de la latence virale. L'action de la protéine Rex dépend d'une séquence spécifique, qui se trouve dans le LTR 3' en amont du site de polyadénylation, et correspond à une grande structure d'ARN formée de multiples boucles, énergétiquement stables, appelée le *Rex responsive element* (RRE) que l'on retrouve également dans l'HTLV-II, le *bovine leukemia virus* et le VIH-1 [16, 17]. La localisation cellulaire de la protéine Rex et sa capacité de liaison au RRE dépendent d'un domaine riche en résidus arginine [18]. Par ailleurs, la protéine Rex fait preuve d'une analogie fonctionnelle avec la protéine Rev du VIH-1, et peut suffire à la réplication de mutants VIH-1 défectifs pour *rev* [17].

### La régulation de l'expression virale est effectuée par les protéines Tax et Rex

Un résumé des mécanismes régulateurs de l'expression d'HTLV-I est présenté dans la figure 4. Immédiatement après l'infection de cellules lymphocytaires T, la transcription

## RÉFÉRENCES

9. Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ. Regulation of the human interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain promoter : activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. *Cell* 1987; 49: 47-56.
10. Böhlein E, Siekevitz M, Ballard DW, et al. Stimulation of the HIV-I enhancer by the HTLV-I tax gene involves the action of inducible cellular proteins. *J Virol* 1988; 63: 1578-86.
11. Green JE. Transactivation of nerve growth factor in transgenic mice containing the human T-cell lymphotropic virus type I tax gene. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4635-41.
12. Lilienbaum A, Duc Dodon M, Alexandre C, Gazzolo L, Paulin D. Effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax protein on activation of the human vimentin gene. *J Virol* 1990; 64: 256-63.
13. Ejima E, Rosenblatt JD, Massari M, et al. Cell type-specific transactivation of the parathyroid hormone-related protein gene promoter by the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) tax and HTLV-II tax proteins. *Blood* 1993; 81: 4 1017-24.
14. Green PL, Chen ISY. Regulation of human T-cell leukemia virus expression. *FASEB J* 1990; 4: 169-75.
15. Hidaka M, Inoue J, Yoshida M, Seiki M. Post transcriptional regulator (rex) of HTLV-I initiates expression of viral structural proteins, but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J* 1988; 7: 519-23.
16. Hanly SM, Rimsky LT, Malim MH, et al. Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-I Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes Dev* 1989; 3: 1534-44.
17. Rimsky LT, Hauber J, Dukovitch M, et al. Functional replacement of the HIV Rev protein by the HTLV-I Rex protein. *Nature* 1988; 335: 738-40.



**Figure 4. Régulation de l'expression d'HTLV-I par les protéines Tax et Rex.** La transcription initiale du provirus est relayée par des facteurs cellulaires aboutissant à la production d'un ARNm génomique. Cet ARNm est épissé de façon différentielle pour engendrer les ARNm codant pour les protéines régulatrices Tax et Rex (gènes précoces), et pour les protéines enzymatiques et de structure Gag, Pol et Env (gènes tardifs). Tax est traduite préférentiellement à partir de l'ARNm tax/rex, et transactive le LTR proviral. Ce stimulus de l'expression virale aboutit à une production graduelle de Rex, qui augmente le niveau cytoplasmique des ARNm non ou simplement épissés, gag/pol et env, aux dépens de l'ARNm tax/rex, favorisant la production des protéines enzymatiques et de structure, et, par là même, la maturation virale. RRE : Rex responsive element. TRE : Tax responsive element.

des gènes viraux dépend de l'interaction de facteurs cellulaires avec les séquences régulatrices de la transcription présentes au niveau du LTR 5'. En l'absence de Rex, seuls les transcrits complètement épissés codant pour Tax/Rex parviennent dans le cytoplasme. En raison de la position respective des codons d'initiation pour Tax et Rex sur ces ARNm, la protéine Tax est traduite préférentiellement et il n'existe initialement qu'une infime quantité de protéine Rex. La transactivation, relayée par Tax sur le LTR d'HTLV-I, va permettre la production en grande quantité d'ARNm codant pour Tax/Rex, aboutissant finalement à une synthèse croissante de Rex. A partir d'un certain seuil, Rex va promouvoir le passage d'ARNm non ou simplement épissé dans le cytoplasme, codant pour les gènes

viraux enzymatiques et de structure. La traduction de ces gènes va alors permettre l'assemblage du virion et son départ de la cellule. Toutefois, en augmentant l'expression cytoplasmique de ces ARNm incomplètement épissés, Rex pourrait indirectement inhiber l'expression du message doublement épissé codant pour Tax/Rex. Cette régulation négative de l'expression des protéines Tax et Rex par Rex aurait pour conséquence de diminuer l'expression de tous les gènes viraux, et d'aboutir, potentiellement, à un stade de latence virale. Par la suite, une augmentation de la production virale pourrait survenir lors de l'activation immunitaire des cellules T infectées. Ainsi, si l'activation de cellules T infectées par HTLV-I de manière latente constitue l'élément déclenchant de l'expression virale, la régu-

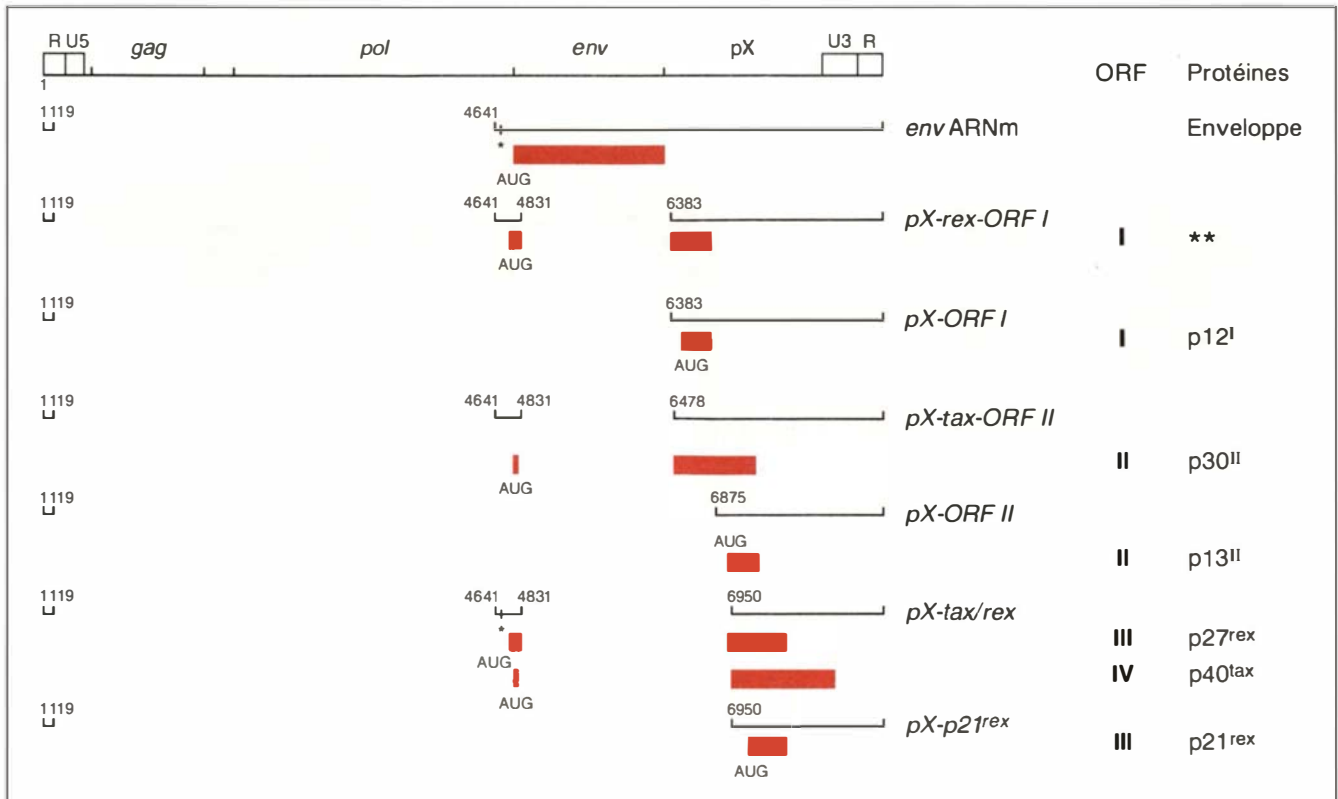


Figure 5. **Le potentiel génétique de la région pX d'HTLV-I est accru par la découverte d'ARNm codant pour les cadres ouverts de lecture (ORF) I et II.** Représentation schématique des ARNm mis en évidence dans une lignée cellulaire lymphocytaire infectée par HTLV-I [19]. Les numéros correspondent à la position nucléotidique des exons par rapport à l'ARN d'HTLV-I. Les rectangles rouges indiquent les protéines potentielles traduites d'après ces ARNm, débutant à leur codon d'initiation AUG, dont le nom est mentionné en marge. ORF: cadre ouvert de lecture (open reading frame), numéroté de I à IV dans la région pX. L'astérisque correspond à un site accepteur d'épissage en position 4658, utilisé dans les ARNm alternativement épissés de l'enveloppe et de tax/r<sub>ex</sub>. \*\* La protéine codée par cet ARNm ne semble pas être exprimée *in vivo*.

lation différentielle de celle-ci par la protéine Rex pourrait servir à alterner des périodes de production virale contrôlée avec un rétablissement de la latence virale. Ce type d'infection chronique, couplée avec une production épisodique de virions, semble être une manière propice d'échapper à la réponse immunitaire, entraînant ainsi l'accumulation graduelle de cellules infectées.

### Découverte de nouveaux ARNm de la région pX

Grâce à l'amplification génomique *in vitro* des ADN complémentaires obtenus après transcription inverse (RT-PCR) de l'ARN extrait d'une lignée cellulaire issue d'un patient ayant une paraparésie spastique tropicale, nous avons récemment

démonstré la présence de nouveaux ARN messagers correspondant aux ORF I et II de la région pX [19] (figure 5). Chacun d'eux peut être synthétisé à partir de deux ARN messagers, simplement ou doublement épissés. Dans l'ARNm pX-r<sub>ex</sub>-ORF I, le premier exon codant de la protéine Rex est ajouté à l'ORF I, et peut coder pour une protéine de 152 acides aminés. En revanche, l'ARNm pX-ORF I permet l'expression d'une protéine de 99 acides aminés, débutant à un codon d'initiation interne (AUG) de l'ORF I. En ce qui concerne l'ORF II, l'épissage alternatif engendre l'ARNm pX-tax-ORF II, où le codon d'initiation de la protéine Tax (et de l'enveloppe) est mis en continu avec l'ORF II, codant pour une protéine de 241 acides aminés. L'ARNm pX-ORF II, finalement, code pour une

protéine de 87 acides aminés, débutant à un codon d'initiation interne de l'ORF II. Un ARNm simplement épissé, dont le potentiel génétique est restreint à la protéine p21<sup>rex</sup>, de fonction inconnue, a également été mis en évidence.

Ces messagers ont pu être détectés *ex vivo* dans les lymphocytes du sang circulant de sujets séropositifs pour HTLV-I, mais aussi de patients atteints de lymphomes à cellules T de l'adulte ou de paraparésie spastique tropicale [19, 20], ainsi que dans des macrophages infectés *in vitro* par l'HTLV-I [21]. L'épissage alternatif des ARNm permet ainsi d'augmenter grandement la complexité génétique d'HTLV-I et lui permet de condenser une quantité importante d'informations dans un nombre de nucléotides relativement petit. Il est à noter que des méca-

## RÉFÉRENCES

- Rimsky LT, Duc Dodon M, Dixon EP, Greene WC. Mutational analysis of the HTLV-I Rex trans-activator: trans-dominant inactivation of HTLV-I and HIV-1 gene expression. *Nature* 1989; 341: 453-6.
- Koralnik IJ, Gessain A, Klotman ME, Lo Monaco A, Berneman ZN, Franchini G. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8813-7.
- Berneman ZN, Gartenhaus RB, Reitz MS Jr, et al. Expression of alternatively spliced HTLV-I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3005-9.
- Koralnik IJ, Lemp JF Jr, Gallo RC, Franchini G. *In vitro* infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Aids Res Hum Retrovir* 1992; 8: 1845-9.
- Ciminale V, Pavlakis G, Derse D, Cunningham CP, Felber BK. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV-I. *J Virol* 1992; 66: 1737-45.
- Koralnik IJ, Fullen J, Franchini G. The p12<sup>I</sup>, p13<sup>II</sup> and p30<sup>III</sup> proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. *J Virol* 1993; 67: 2360-6.
- Mulloy JC, Boeri E, Koralnik IJ, et al. Interaction of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I) P12<sup>I</sup> with the interleukin 2 receptor (IL2R)  $\beta$ -chain: mapping of the interacting domains of both proteins. *Cold Spring Harbour* 1993.

nismes similaires ont été récemment décrits en ce qui concerne l'HTLV-II [22] et le *bovine leukemia virus*, qui font partie de la même famille de rétrovirus. L'ORF I comporte une analogie de séquence importante entre ces virus, ce qui suggère que la conservation de cette région relativement large du génome viral reflète la production de protéines similaires.

### Caractérisation de trois nouvelles protéines d'HTLV-I

Les ADN complémentaires de ces ARNm ont été synthétisés par RT-PCR et clonés dans un vecteur d'expression eucaryote. Après transfection dans des cellules Hela-Tat et Cos, le poids moléculaire des protéines produites a été déterminé par radio-immunoprécipitation et électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, et leur localisation intracellulaire analysée par immunofluorescence indirecte. L'ARNm pX-ORF I code pour une nouvelle protéine hydrophobe de 99 acides aminés, riche en proline et leucine, ayant une masse moléculaire apparente de 12 kDa, appelée p12<sup>I</sup> [19]. Elle se trouve au niveau périmoléculaire et de manière tachetée dans le cytoplasme, suggérant une localisation dans les endomembranes cellulaires [23] (*figure 6*). L'analyse de la séquence de cette protéine démontre, par ailleurs, la présence de deux domaines transmembranaires potentiels. Il a été récemment démontré [24] que cette protéine se lie de manière spécifique à la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'interleukine 2. Par ailleurs, une analogie structurale et fonctionnelle existe entre la p12<sup>I</sup> et la protéine oncogène E5 du papillomavirus bovin. Ces deux protéines ont une localisation intracellulaire identique et se lient à une composante de 16kDa des pompes à protons vacuolaires [25]. Cette découverte récente va permettre d'explorer de nouvelles voies de recherche, et constitue un exemple d'évolution convergente entre virus à ARN et à ADN. En effet, l'HTLV-I, contrairement à d'autres oncornavirus animaux, ne contient pas d'oncogène défini. Au

contraire, avec sa composition multigénique, ce virus ressemble plutôt aux virus à ADN transformants tels que les papillomavirus, adénovirus et papovavirus (*simian virus 40*). Tout comme HTLV-I, ces virus à ADN contiennent des gènes transactivateurs, et leur mécanisme de transformation cellulaire implique en général la coopération de plusieurs protéines virales.

L'ARNm pX-rer-ORF I code potentiellement pour une protéine de 152 acides aminés qui contient le domaine riche en arginine se liant à l'ARN (*arginin rich RNA binding domain*) de la protéine p27<sup>Rex</sup>. La traduction de ce messenger *in vitro* a permis d'identifier une protéine de 27 kDa (Rof) [22], mais celle-ci ne semble pourtant pas être synthétisée *in vivo* [23].

L'analyse de la traduction des transcrits viraux de l'ORF II a permis la mise en évidence de deux nouvelles protéines nucléaires de 13 et 30kDa. La p13<sup>II</sup>, codée par l'ARNm pX-ORF II, est une protéine de 87 acides aminés, qui se trouve dans la matrice nucléaire [23] (*figure 5*), alors que la p30<sup>III</sup>(Tof) [22], codée par l'ARNm pX-tax-ORF II, se localise principalement au niveau nucléolaire [22, 23] (*figure 6*). Cette dernière comporte une certaine analogie avec des facteurs activateurs de la transcription, mais sa fonction demeure actuellement encore inconnue. La détection de ces protéines dans les lymphocytes de patients séropositifs pour HTLV-I et l'étude de leur rôle dans la différenciation cellulaire sont en cours d'investigation, mais ont été limitées par le niveau d'expression, probablement très faible, et par la qualité des anticorps disponibles [19].

La nouvelle carte génomique d'HTLV-I est représentée dans la *figure 7* et un résumé des protéines de la région pX se trouve dans le *tableau I*. Ainsi, HTLV-I produit deux protéines nucléolaires, p30<sup>III</sup> et p27<sup>Rex</sup>, deux protéines nucléaires, p13<sup>II</sup> et p40<sup>Tax</sup>, et deux protéines cytoplasmiques, p12<sup>I</sup> et p21<sup>Rex</sup>. La présence simultanée de ces protéines virales dans trois compartiments cellulaires distincts reflète la complexité de l'interaction d'HTLV-I avec son hôte.

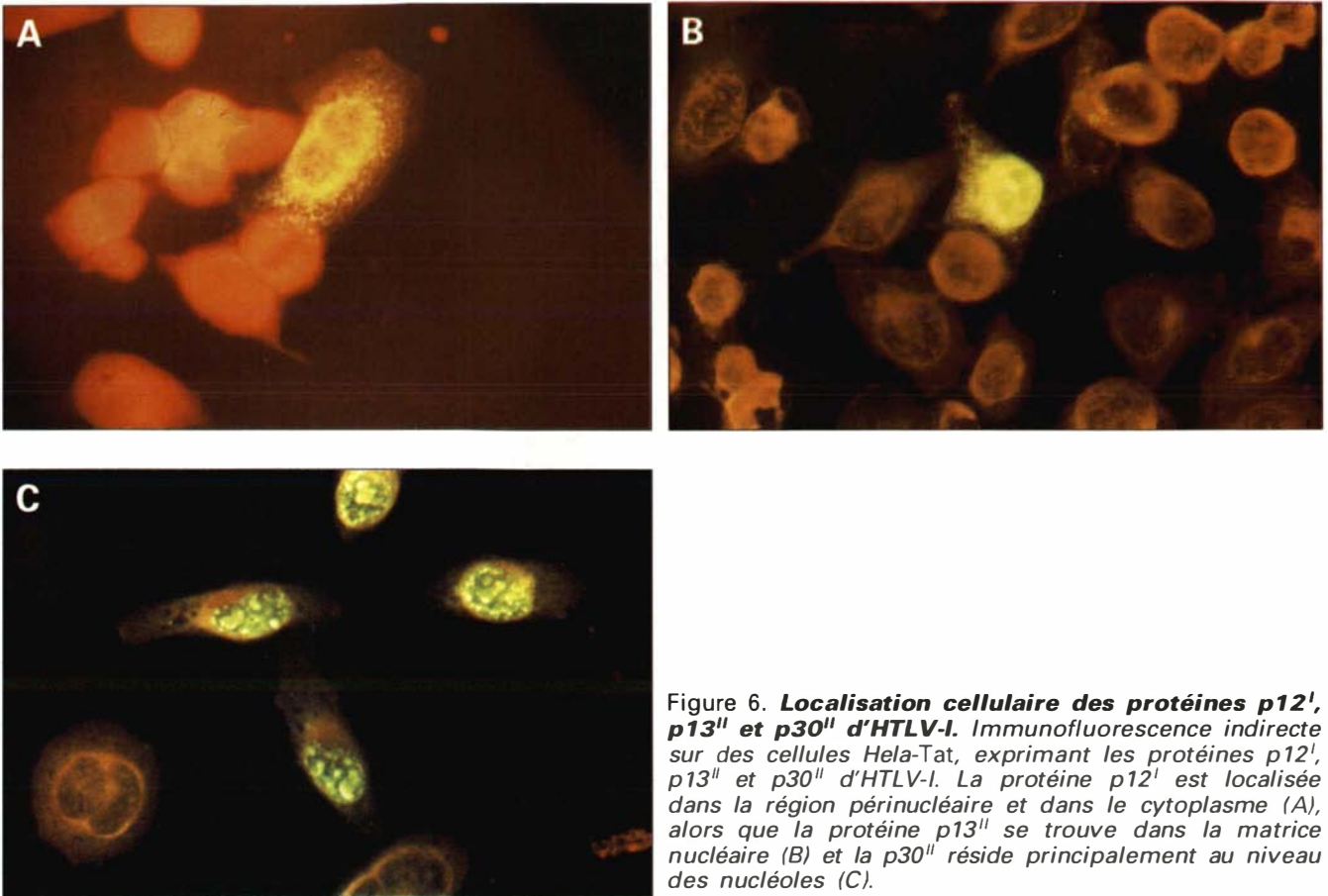


Figure 6. **Localisation cellulaire des protéines p12<sup>I</sup>, p13<sup>II</sup> et p30<sup>II</sup> d'HTLV-I.** Immunofluorescence indirecte sur des cellules HeLa-Tat, exprimant les protéines p12<sup>I</sup>, p13<sup>II</sup> et p30<sup>II</sup> d'HTLV-I. La protéine p12<sup>I</sup> est localisée dans la région périnucléaire et dans le cytoplasme (A), alors que la protéine p13<sup>II</sup> se trouve dans la matrice nucléaire (B) et la p30<sup>II</sup> réside principalement au niveau des nucléoles (C).

### Hypothèses sur les mécanismes pathogènes d'HTLV-I

Le lymphome à cellules T de l'adulte est la conséquence d'une expansion monoclonale de cellules T, généralement CD4<sup>+</sup>, infectées par l'HTLV-I. Pourtant, l'HTLV-I ne contient pas d'oncogène au sens propre, et le site d'intégration dans le génome des cellules tumorales n'est pas spécifique. Il est probable qu'une série complexe d'événements (carcinogénèse en plusieurs étapes) soit à l'origine de l'émergence d'une leucémie, qui, en général, survient entre vingt et cinquante ans après une infection initiale lors de l'allaitement. La première stimula-

tion mitogène des lymphocytes T induite par l'HTLV-I survient au contact de la protéine externe d'enveloppe (gp46) [26]. Par la suite, la production de Tax par les cellules infectées entraîne l'expression d'IL 2 et de son récepteur IL 2R $\alpha$ , induisant ainsi un mécanisme autocrine/paracrine favorisant la prolifération des lymphocytes T, et, par conséquent, la réplication virale. Par ailleurs, la production de GM-CSF par les cellules infectées pourrait également jouer un rôle, par l'intermédiaire de macrophages activés produisant de l'IL1. Celle-ci, à son tour, va augmenter la production d'IL2 et d'IL2R dans les lymphocytes T. La découverte récente du pouvoir de liaison de la

protéine p12<sup>I</sup> à la chaîne  $\beta$  de l'IL2R [24] est particulièrement intéressante dans ce contexte et demande la poursuite d'investigations fonctionnelles.

Un des paradoxes de l'infection à HTLV-I est qu'il n'existe, *in vivo* dans les cellules infectées, pas d'expression virale détectable par les techniques usuelles d'immunofluorescence ou de *Northern blot*. Cela suggère que HTLV-I ne serait qu'un élément initiateur de la transformation cellulaire, et que de multiples phénomènes successifs seraient responsables du développement et du maintien de la leucémogénèse par la suite. Toutefois, un faible degré d'expression virale *in vivo* a été récemment démontré grâce à la



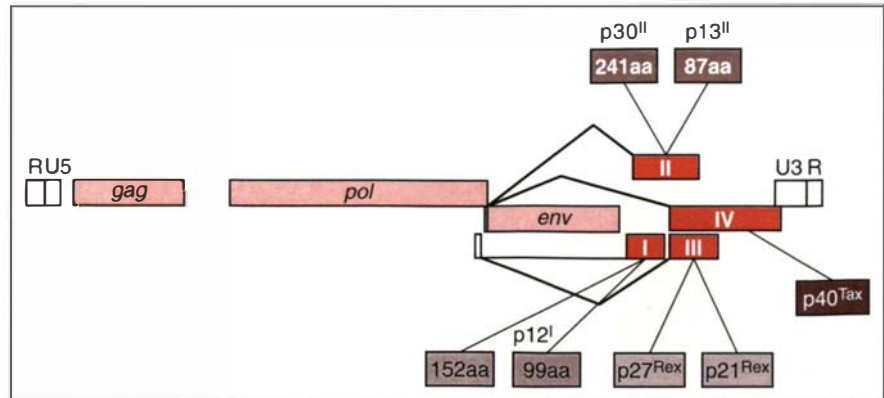


Figure 7. **Carte génétique d'HTLV-I.** Nouvelle représentation du génome d'HTLV-I. Les protéines codées par les cadres ouverts de lectures (ORF) I à IV de la région pX sont représentées dans les rectangles correspondants. Le nombre d'acides aminés et la taille relative en kDa des différentes protéines sont indiqués.

## RÉFÉRENCES

25. Franchini G, Mulloy JC, Koralknik IJ, *et al.* The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I p12<sup>I</sup> protein cooperates with the E5 oncoprotein of bovine papillomavirus in cell transformation and binds the 16 kDa subunits of vacuolar H<sup>+</sup> ATPase. *J Virol* 1993; 67: 7701-4.
26. Gazzolo L, Duc Dodon M. Human T cell lymphotropic virus type I is a direct activator of resting T lymphocytes. *Nature* 1987; 326: 714-7.
27. Gessain A, Louie A, Gout O, Gallo RC, Franchini G. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type I expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. *J Virol* 1991; 65: 1628-33.
28. Tendler CL, Greenberg SJ, Blattner WA, *et al.* Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5218-22.
29. Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 1992; 117: 933-46.
30. Gessain A, Gallo RC, Franchini G. The low degree of HTLV-I genetic drift *in vivo* as a means to follow viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 1992; 66: 2288-95.
31. de Revel T, Mabondzo A, Gras G, *et al.* *In vitro* infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type I. *Blood* 1993; 81: 1598-606.
32. Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 1990; 348: 245-8.

Nom	Taille	ORF	Localisation	Fonction
p40 <sup>Tax</sup>	353	IV	matrice nucléaire	transactivation
p27 <sup>Rex</sup>	189	III	nucléoles	régulation post-transcriptionnelle
p21 <sup>Rex</sup>	111	III	cytoplasme	inconnue
p12 <sup>I</sup>	99	I	cytoplasme	liaison avec prot. 16K, IL2 réc.
p13 <sup>II</sup>	87	II	matrice nucléaire	inconnue
p30 <sup>II</sup>	241	II	nucléoles	inconnue

La protéine p30<sup>II</sup> a également été appelée Tof [22]. La traduction de l'ARNm pX rex-ORF I *in vitro* a permis la production d'une protéine de 27 kDa, appelée Rof [22], mais celle-ci ne semble pas être exprimée *in vivo* [19]. ORF: open reading frame de la région pX. La taille correspond au nombre d'acides aminés.

technique de RT-PCR dans les lymphocytes de patients infectés [19, 20, 27, 28]. Néanmoins, chez les patients atteints de lymphomes à cellules T de l'adulte, son rôle dans la persistance du processus leucémique demeure actuellement inconnu, d'autant que l'on ne sait pas si cette expression virale survient dans les cellules leucémiques elles-mêmes ou dans les cellules infectées mais non transformées, présentes également en faibles quantités chez ces patients. Le développement de nouvelles techniques, telles que la PCR *in situ*, permettra probablement de

résoudre cette question dans un proche avenir. La paraparésie spastique tropicale est une neuromyéopathie chronique caractérisée par une infiltration médullaire périvasculaire par des cellules inflammatoires à prédominance lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>, aboutissant à une destruction axonmyélinique et à une atrophie médullaire médio-thoracique [29]. Toutefois, l'HTLV-I ne semble pas en lui-même neurotrope: ce virus n'a jamais été mis en évidence de manière convaincante directement dans les cellules du système nerveux.

Par ailleurs, l'analyse moléculaire de souches virales provenant de patients atteints de myélopathie n'a pas révélé de différences significatives comparées aux isolats issus de patients leucémiques ou de porteurs sains [30]. En revanche, l'infection de macrophages humains est possible *in vitro* [21, 31], permettant d'élaborer de nouvelles hypothèses quand aux mécanismes d'action de ce virus au sein du système nerveux, par analogie avec VIH-I : les macrophages sont impliqués dans le transport de ce virus à travers la barrière hématoencéphalique. Une libération *in situ* dans le micro-environnement local de lymphokines/cytokines neurotoxiques tel le *tumor necrosis factor*  $\beta$  est aussi une éventualité. La présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, avec restriction HLA de type I, et la présence de titres élevés d'anticorps spécifiques dans le sang périphérique, mais surtout dans le LCR, de patients atteints de parapésie spastique tropicale, a également suggéré l'implication du système immunitaire à l'origine de cette maladie [32]. Cette réaction pourrait cependant n'être que le reflet de la charge virale importante, présente dans les cellules CD4<sup>+</sup>, caractéristique de cette affection. Dans ce cas, ces lymphocytes T cytotoxiques pourraient n'être dirigés que contre les quelques cellules productives d'HTLV-I au milieu du large collectif de cellules CD4<sup>+</sup> infectées. Alternativement, cette réaction cytotoxique pourrait être dirigée contre des cellules du système nerveux encore non identifiées, exprimant des antigènes viraux, ou des déterminants cellulaires responsables d'une réactivité croisée. Finalement, le fait que la protéine p12<sup>I</sup> soit capable de se lier à une composante de 16K de l'ATPase-H<sup>+</sup> vacuolaire [25] mérite de plus amples investigations. En effet, cette pompe à protons permet l'acidification du contenu d'organites cellulaires tels que les lysosomes, qui jouent un rôle dans la modulation de l'interaction entre ligands et récepteurs. Comme cette ATPase-H<sup>+</sup> est aussi présente au niveau des vésicules synaptiques, la protéine p12<sup>I</sup> pourrait également avoir une influence sur la neurotransmission.

m/s n° 3 vol. 10, mars 94

## Conclusion

La région pX de l'HTLV-I joue donc un rôle majeur dans la régulation de l'expression et de la latence virales, mais aussi dans les mécanismes de transformation des cellules infectées. La découverte récente de nouvelles protéines codées par cette région, ainsi que la détection d'une expression virale *in vivo*, ouvre de multiples voies de recherche dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des deux affections majeures associées à ce virus, mais aussi des maladies de type uvéite, arthrite ou polymyosite qui ont été plus récemment associées à l'HTLV-I dans certaines zones de forte endémie. La prévention de la transmission virale par dépistage des donneurs de sang, modification des modalités de l'allaitement chez les femmes infectées, mais surtout mise au point d'une vaccination apparaît essentielle pour lutter contre ce virus qui infecte entre 15 et 20 millions d'individus dans le monde ■

## Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr G. Franchini du Laboratory of Tumor Cell Biology au National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, pour son aide. Une partie importante du travail présenté dans cette synthèse a été effectuée sous sa direction dans le cadre d'un stage post-doctoral financé par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique. Nous remercions le Dr R.C. Gallo pour son support constant.

## Summary

### Structure and function of the proteins encoded by the pX region of HTLV-I

HTLV-I, like other retroviruses, contains the genes *gag*, *pol* and *env*. These genes encode the core proteins, the protease, the reverse transcriptase and the surface and transmembrane glycoproteins, respectively. In addition, this virus harbors a unique 2 kb region located at the 3' end of the *env* gene. This region, initially called pX, was found to play a major role in leukemogenesis and viral expression. Until 1992, this part of the viral genome was considered as encoding a unique doubly spliced mRNA of 2.1 kb, allowing the expression of three proteins: p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup> and p21<sup>Rex</sup>. p40<sup>Tax</sup> is a nuclear phosphoprotein which upregulates viral replication at the level of the LTR and transactivates numerous cellular genes. p27<sup>Rex</sup>, a nucleolar phosphoprotein, is a posttranscriptional regulator of viral expression. The function of the p21<sup>Rex</sup> protein is currently unknown. Recently, novel mRNAs encoded by the pX region have been identified by reverse transcriptase-PCR in HTLV-I infected cell-lines as well as in lymphocytes from HTLV-I seropositive patients. These mRNAs encode proteins of 12, 13 and 30 kd, localised in the cytoplasm, the nucleus and the nucleolus, respectively. Thus HTLV-I, like HIV, has developed fine posttranscriptional alternative splicing mechanisms to increase the complexity of its genome. The discovery of these proteins might provide new insights in the study of HTLV-I associated diseases.

## TIRÉS A PART

I. J. Koralnik.