

Int-6, nouveau constituant des corps nucléaires contenant PML, est délocalisée par la protéine Tax du virus HTLV-1

HTLV-1 a été le premier rétrovirus pathogène découvert chez l'homme. Dans les zones de forte endémie virale – sud du Japon, Caraïbes, Afrique intertropicale, Amérique latine et Mélanésie – jusqu'à 30 % de la population est infectée. La transmission d'HTLV-1 peut se faire par allaitement, contacts sexuels et transfusions. HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL pour *adult T-cell leukemia*) et d'une neuromyélopathie chronique, la paraparesie spastique tropicale (TSP/HAM pour *tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy*). L'infection par HTLV-1 est aussi associée à plusieurs autres manifestations cliniques : polymyosites, arthrites, dermatites, exocrinopathies à type syndrome de Sjögren, pneumopathies interstitielles lymphoïdes et uvéites [1].

Outre les trois gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent pour les protéines de structure des rétrovirus, HTLV-1 possède une région particulière appelée *pX* qui contient au moins quatre cadres de lecture codant pour les protéines p12ⁱ, p13^h, p30^h (ou Tof), Rof, Rex et Tax [2]. Les quatre premières protéines ont été découvertes récemment et leur rôle dans le cycle viral est mal connu. On sait, en revanche, que les protéines Rex et Tax sont nécessaires à la réplication virale : Rex contrôle l'abondance relative des différents ARNm viraux et Tax augmente la transcription à partir du promoteur d'HTLV-1. Plusieurs travaux indiquent que Tax joue un rôle clé dans la genèse des affections associées à l'infection par HTLV-1. Tax transforme en effet des lymphocytes T établis en culture primaire [3] et, dans des souris transgéniques expri-

mant Tax, on observe des effets myélogénératifs et des modifications de la prolifération cellulaire qui peuvent être rapprochés de certaines anomalies observées chez les sujets infectés par HTLV-1 [4, 5].

Pour avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le développement des affections associées à l'infection par HTLV-1, nous avons entrepris un travail d'identification des différents partenaires protéiques de Tax par le système du double hybride dans la levure [6]. Nous avons criblé une banque d'ADNc de lymphocytes B humains immortalisés par le virus d'Epstein-Barr avec la protéine Tax comme appât. Deux des clones isolés codent pour l'équivalent humain du produit du gène *int-6*. Ce gène *int-6* (*integration site 6*) est le sixième membre d'une famille de gènes dont l'expression est dérégulée par l'intégration du virus MMTV [7]. Le virus peut s'intégrer à plusieurs endroits dans le gène, aboutissant dans tous les cas à la production de protéines Int-6 tronquées. Ces travaux suggèrent que Int-6 serait un inhibiteur de la prolifération cellulaire.

La protéine Int-6, parfaitement conservée entre l'homme et la souris, ne présente pas de similitude avec d'autres protéines connues. Nous avons étudié la localisation intracellulaire de Int-6 [8]. Des cellules COS7 ou HeLa ont été transfectées avec un vecteur d'expression de *int-6* placé en fusion avec la séquence codant pour l'épitope Flag. Les cellules soumises à un marquage immunofluorescent ont été examinées en microscopie confocale. Int-6 est concentrée sous forme de points hétérogènes en taille et en nombre,

dispersés dans tout le noyau sauf les nucléoles (*figure 1A*). Ce profil d'immunofluorescence apparaissait similaire à celui décrit pour d'autres protéines nucléaires, en particulier la protéine PML (*promyelocytic leukemia*). PML est en effet localisée au niveau de structures particulières appelées « corps nucléaires » ou POD (*PML oncogenic domains*) qui correspondent à des complexes multiprotéiques [9, 10]. Par des expériences de double marquage en immunofluorescence à partir de cellules synthétisant la protéine de fusion Flag-Int-6, nous avons pu mettre en évidence une parfaite co-localisation de Int-6 avec la protéine PML endogène dans les corps nucléaires (*figure 1A-C*). Grâce à la production d'un anticorps polyclonal dirigé contre les 20 derniers acides aminés de Int-6, nous avons confirmé que la protéine Int-6 endogène est aussi localisée dans ces mêmes structures nucléaires.

Si Int-6 est co-synthétisée avec la protéine Tax, elle n'est plus retrouvée au niveau des corps nucléaires. Int-6 et Tax sont alors co-localisées dans le cytoplasme sous la forme d'un marquage périnucléaire intense et diffus (*figure 1D-F*). Synthétisée seule, Tax est retrouvée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (*figure 1H*). Cette situation d'exclusion des corps nucléaires est à rapprocher de ce qui a été décrit dans les cellules de leucémie aiguë promyélocytaire [9, 10]. Dans cette leucémie associée à une translocation chromosomique t(15; 17) qui juxtapose les gènes *PML* et *RAR α* (récepteur de l'acide rétinique α), il y a production d'une protéine de fusion *PML/RAR α* qui n'est plus localisée dans les corps nucléaires mais dans de multiples

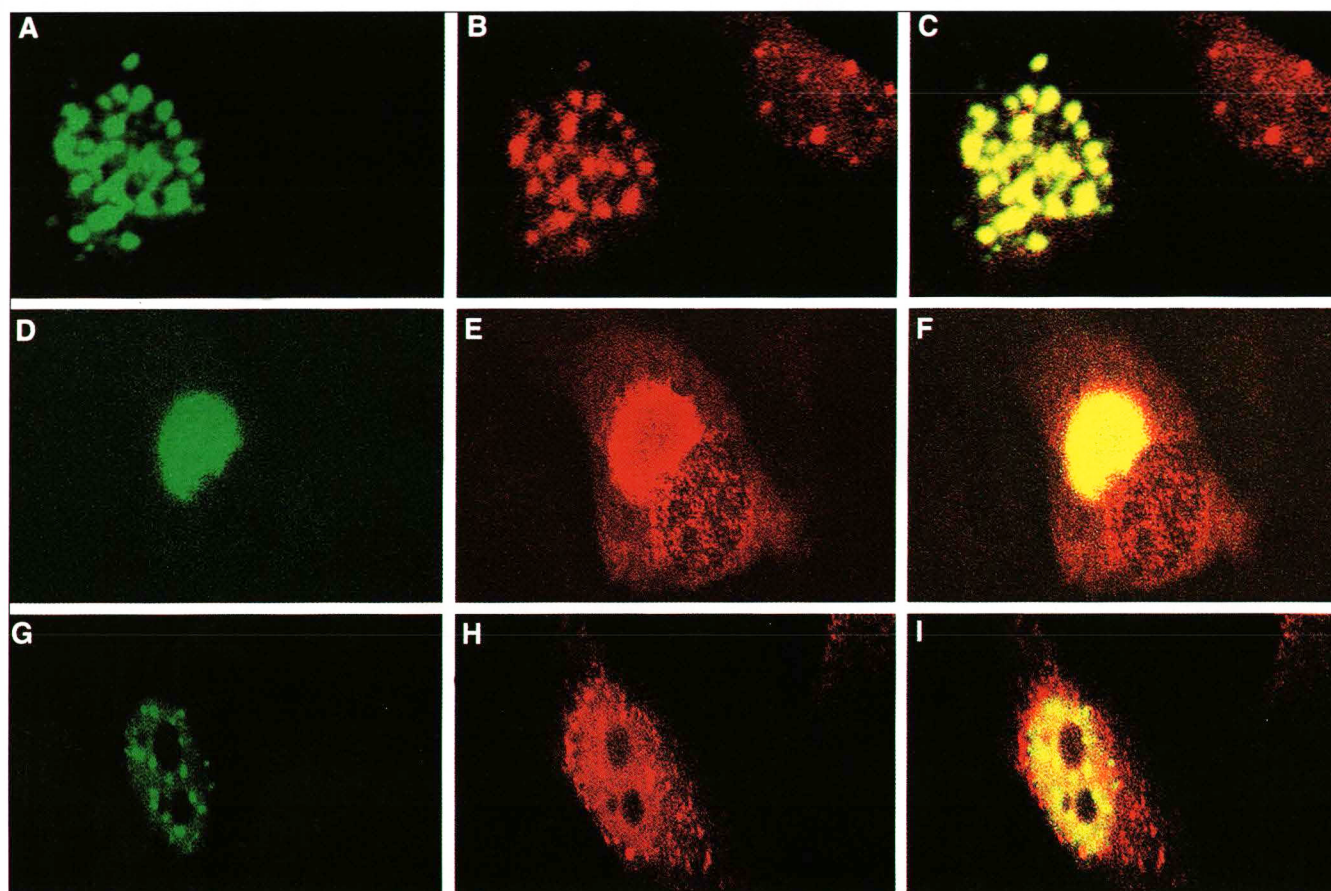


Figure 1. **Immunofluorescences en microscopie confocale montrant que Tax déplace spécifiquement la protéine Int-6 des corps nucléaires contenant PML.** (A-C) Des cellules COS7 transfectées avec un vecteur d'expression du gène int-6 ont été soumises à un double marquage en immunofluorescence. Les marquages spécifiques de Int-6 surexprimée et de PML endogène sont respectivement en vert et en rouge. La superposition des deux marquages apparaît en jaune. On observe une parfaite co-localisation des deux protéines Int-6 et PML dans le noyau, au niveau des corps nucléaires. (D-F) Des vecteurs d'expression de int-6 et de tax ont été transfectés dans des cellules COS7. Les marquages en vert et rouge correspondent respectivement à Int-6 et Tax. Int-6, co-synthétisée avec la protéine Tax, n'apparaît plus au niveau des corps nucléaires ; les deux protéines sont co-localisées dans le cytoplasme sous forme d'un marquage péri-nucléaire intense. (G-I) Les cellules ont été transfectées avec un plasmide exprimant tax. PML endogène apparaît ici en vert et Tax en rouge. Synthétisée seule (H), Tax est retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Lorsque les deux protéines sont co-synthétisées, le marquage en points du noyau caractéristique de PML est maintenu.

structures microponctuées. PML, capable de former des hétérodimères avec PML/RAR α , est également délocalisée dans ces microparticules ainsi que d'autres constituants des corps nucléaires. L'administration d'acide rétinoïque induit une rémission de la leucémie avec réapparition des corps nucléaires. Afin de savoir si Tax désorganise le corps nucléaire dans

son ensemble nous avons regardé la localisation de PML dans des cellules synthétisant Tax. Le marquage en points dans le noyau caractéristique de PML est maintenu en présence de Tax (figure G-I), indiquant que Tax déplace spécifiquement Int-6. Au vu de ces résultats, nous proposons que l'interaction de Tax avec Int-6 entraînerait l'inactivation de

Int-6 en la détournant de son site d'action naturelle. Si la fonction de Int-6 est de régler négativement la prolifération cellulaire [7], alors son inactivation par Tax pourrait participer aux désordres prolifératifs associés à l'infection par HTLV-1.

C.D.
P.J.

1. De Thé G, Gessain A. HTLV-1 1992, aspects moléculaires et immunoprévention. *médecine/sciences* 1992; 8: 205-7.

2. Koralnik IJ, Gessain A. Virus HTLV-1 : structure et fonction des protéines de la région pX. *médecine/sciences* 1994; 10: 296-305.

3. Grassmann R, Dengler C, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dokhelar MC, Sodroski JG, Haseltine WA. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3351-5.

4. Briand P. Souris transgéniques et modèles d'étude du virus HTLV-1. *médecine/sciences* 1992; 8: 208-13.

5. Grossman WJ, Kimata JT, Wong FH, Zutter M, Ley TJ, Ratner L. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1057-61.

6. Plessis A, Camonis JH. Le système double-hybride, mode d'emploi. *médecine/sciences* 1994; 10: I-IX.

7. Marchetti A, Buttiati F, Miyazaki S, Gallahan D, Smith GH, Callahan R. Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. *J Virol* 1995; 69: 1932-8.

8. Desbois C, Rousset R, Bantignies F, Jalinot P. Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-1 Tax oncoprotein. *Science* 1996; 273: 951-3.

9. De Thé H, Koken M, Stadler M, Daniel MT, Puvion E, Chomienne C, Degos L. Un nouveau compartiment nucléaire, révélé par des autoanticorps de la cirrhose biliaire primitive, pourrait être impliqué dans la pathogénie de la leucémie aiguë promyélocytaire. *médecine/sciences* 1994; 10: 577-82.

10. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinique : le paradoxe. *médecine/sciences* 1994; 10: 17-824.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ Les fonctions des chimiokines ne sont pas toutes redondantes !

Récemment, l'équipe de Marc Parmentier et de Gilbert Vassart (ULB, Belgique) a rapporté l'observation de sujets normaux dont la fonction du récepteur CCR5 était détruite par une mutation, et qui se trouvaient ainsi protégés contre l'infection par le VIH dont CCR5 est un co-récepteur au niveau des macrophages (*m/s* n° 8/9, vol. 12, p. 1037). L'absence des conséquences pathologiques de la mutation du gène *CCR5* était mise sur le compte d'une redondance fonctionnelle. Dans un récent article, Höpken *et al.* (Boston, MA, USA) montrent que cette redondance n'est pas un phénomène général. Ces auteurs ont inactivé par recombinaison homologue les deux allèles du gène codant pour le récepteur du chimio-attractant C5a, principalement synthétisé dans les cellules du lignage myéloïde, les hépatocytes et les cellules épithéliales. Les souris homozygotes déficientes ont un développement strictement normal mais une sensibilité très augmentée à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*, qu'il soit administré par voie intrabronchique ou sous-cutanée. Le phénotype est donc ici très cohérent avec une anomalie de la réponse des neutrophiles à cette bactérie. Cependant, la phy-

siopathologie des lésions n'évoque pas du tout un chimiotactisme anormal : *Pseudomonas* colonise le poumon infecté en dépit d'une réponse inflammatoire et d'un afflux accru de polynucléaires neutrophiles qui semblent être incapables d'éliminer l'agent pathogène. Ces lésions rappellent beaucoup celles observées chez les malades atteints de mucoviscidose : absence d'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* en dépit d'une réponse inflammatoire extrêmement forte, avec afflux de polynucléaires neutrophiles qui contribue à aggraver les lésions (*m/s* n° 7, vol. 11, p. 1046). Les auteurs proposent donc qu'une perturbation de l'interaction entre le facteur C5a et son récepteur pourrait jouer un rôle pathogénique dans les complications pulmonaires de la mucoviscidose.

[1. Höpken UE, *et al.* *Nature* 1996; 383: 86-9.]

■■■ La protéine Bcl2, une cible du pouvoir pro-apoptotique de la protéase du VIH. Les lymphocytes infectés par le virus du SIDA, le VIH, meurent rapidement par apoptose *ex vivo* et, probablement, *in vivo*. L'effet cytotoxique de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 semble

être l'un des mécanismes de cette apoptose. Cependant, la synthèse intracellulaire de la protéase du VIH provoque également une apoptose rapide si bien que cet effet pourrait se surajouter à celui de la gp120. Une équipe industrielle américaine vient de démontrer que cette protéase du VIH était capable de cliver la protéine anti-apoptotique Bcl2 entre la phénylalanine 112 et l'alanine 113. Associée à une activation du facteur de transcription NFκB, cette inactivation de Bcl2 sensibilise les cellules à l'apoptose [1]. Il faut remarquer que ce déclenchement de l'apoptose par le virus VIH est un phénomène singulier puisque la majorité des autres virus possède, au contraire, des systèmes anti-apoptotiques permettant de garder le plus longtemps possible en vie les cellules dans lesquelles ils se répliquent. Dans le cas du VIH, il se pourrait que le déclenchement de l'apoptose, suivi d'une phagocytose des corps apoptotiques par des monocytes/macrophages, fût en réalité une stratégie permettant d'infecter ces dernières cellules facilement et, du fait de leur mobilité, de diffuser l'infection dans tout l'organisme.

[1. Strack PR, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9571-6.]