

La protéine Tat du VIH : cible potentielle en chimiothérapie antirétrovirale

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) contient des séquences codantes pour des protéines régulatrices, parmi lesquelles Tat et Rev, qui jouent des rôles stratégiques dans la réplication du virus. Ces protéines contrôlent l'expression du génome viral par interaction avec des régions spécifiques de l'ARN viral. Le rôle essentiel de la protéine Tat dans l'expression du virus et son implication dans la pathogénicité du VIH font de cette protéine une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapeutiques antivirales. Les connaissances acquises concernant la structure de Tat et sa caractérisation moléculaire permettent de proposer de nouvelles approches pour identifier des inhibiteurs spécifiques de la fonction de Tat, ribozymes, oligonucléotides antisens ou compétiteurs divers. Des tests automatisés du pouvoir transactivateur de Tat permettent aussi d'évaluer l'effet de très nombreuses molécules par criblage systématique, aboutissant à des « têtes de file » dont il s'agit ensuite d'améliorer les propriétés par diverses transformations chimiques.

Martine Sinet
Joanna Kubar
Roger Condom
Nadia Patino
Roger Guedj

ADRESSE

M. Sinet : *chargée de recherche Inserm*. Inserm U. 13, 190, boulevard Mac Donald, 75019 Paris, France. J. Kubar : *chargée de recherche Cnrs*. Laboratoire de pharmacologie, faculté de médecine, université de Nice-Sophia Antipolis, 06107 Nice Cedex 2, France. R. Condom : *maître de conférences*, N. Patino : *maître de conférences*, R. Guedj : *professeur des universités*. Laboratoire de chimie bio-organique, BP 71, faculté des sciences, université de Nice-Sophia Antipolis, 06108 Nice Cedex, France.

L'expression du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est contrôlée par un certain nombre de protéines parmi lesquelles les protéines virales Tat et Rev qui participent au réveil et à la dissémination du virus [1]. L'expression fonctionnelle de la protéine transactivatrice Tat entraîne une augmentation importante de l'expression du VIH contrôlée par le LTR (*long terminal repeat*) du fait de l'interaction entre la protéine et la région TAR (*trans-activation responsive element*), séquence d'ARN présente à l'extré-

mité 5' de tous les ARN viraux. La découverte de l'activité de Tat par Sodroski *et al.* en 1985 [2] a stimulé de nombreuses recherches pour élucider le mécanisme d'action de cette protéine et établir des tests permettant d'identifier des produits qui pourraient inhiber la *trans*activation par Tat. A ce jour, la somme des résultats obtenus, qui ont souvent fait l'objet de vives controverses, permet de dresser un tableau relativement cohérent des modalités de l'action de Tat et d'ouvrir de nouvelles perspectives en chimiothérapie antirétrovirale. Les deux propriétés

majeures de la protéine Tat du VIH que sont la nécessité de sa présence pour la réplication du virus et son caractère unique (on ne connaît pas de protéine cellulaire homologue), en font une cible de choix pour de nouvelles thérapeutiques anti-VIH.

Structure et caractérisation moléculaire de Tat

La protéine Tat est codée par deux exons situés, dans le génome viral, de part et d'autre du gène *env*. Cette protéine est constituée respectivement de 86 ou 130 acides aminés pour le VIH-1 et le VIH-2. Seuls les 67 premiers acides aminés, correspondant à l'extrémité 5' du premier exon, sont indispensables pour une complète activité de la protéine. L'activité *trans*-activatrice de mutants de la protéine Tat a pu être déterminée par la mesure de l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des séquences régulatrices LTR du VIH. Ces études ont permis de délimiter les régions essentielles à l'activité de Tat: la région N-terminale de la protéine (acides aminés 1-57), comprenant quatre régions fonctionnelles différentes, est essentielle à l'activité de Tat. Il s'y associe une région auxiliaire (acides aminés 58-67) qui renforce l'activité de la région essentielle (figure 1). Les régions 2, 3 et 4 sont identiques dans les VIH-1 et VIH-2 [3-5].

La première région (acides aminés 1-18) est constituée de deux acides glutamiques, un acide aspartique et de trois motifs répétés Pro-XXX-Pro. Cette structure, où apparaît une périodicité de résidus acides, polaires, et hydrophobes, contribue à la formation d'une hélice α caractéristique de nombreux activateurs de transcription chez les eucaryotes. La signification fonctionnelle de cette région n'est pas clairement établie; il est possible de la remplacer par une séquence hétérologue comportant une hélice α ou de substituer des résidus leucine à la proline sans que l'activité de Tat soit notablement affectée [6]. Cette région N-terminale pourrait interagir avec les protéines cellulaires. Une protéine de liaison à Tat (TBP-1) a pu être

identifiée [7]; elle est présente dans le noyau d'une grande variété de cellules et pourrait moduler la stimulation du LTR par Tat.

La région II comprenant les acides aminés 19-40 contient 7 cystéines et la substitution d'une seule d'entre elles (à l'exception de la cystéine 31) abolit totalement l'activité de la protéine Tat, indiquant par là l'importance de ces groupements [3, 6]. Une substitution des acides aminés non cystéiniques réduit de manière significative l'activité de Tat [8], sug-

gérant que toute la séquence est importante pour la fonction de la protéine, son rôle le plus probable étant d'en stabiliser la structure. Dans certaines conditions de purification de la protéine Tat recombinante, l'existence d'homodimères a pu être observée; les cystéines seraient liées à 4 ions divalents, Zn^{2+} ou Cd^{2+} formant un motif en doigt de zinc, caractéristique des protéines de régulation de l'ADN ou de l'ARN [9]. La présence de ces dimères n'est cependant pas néces-

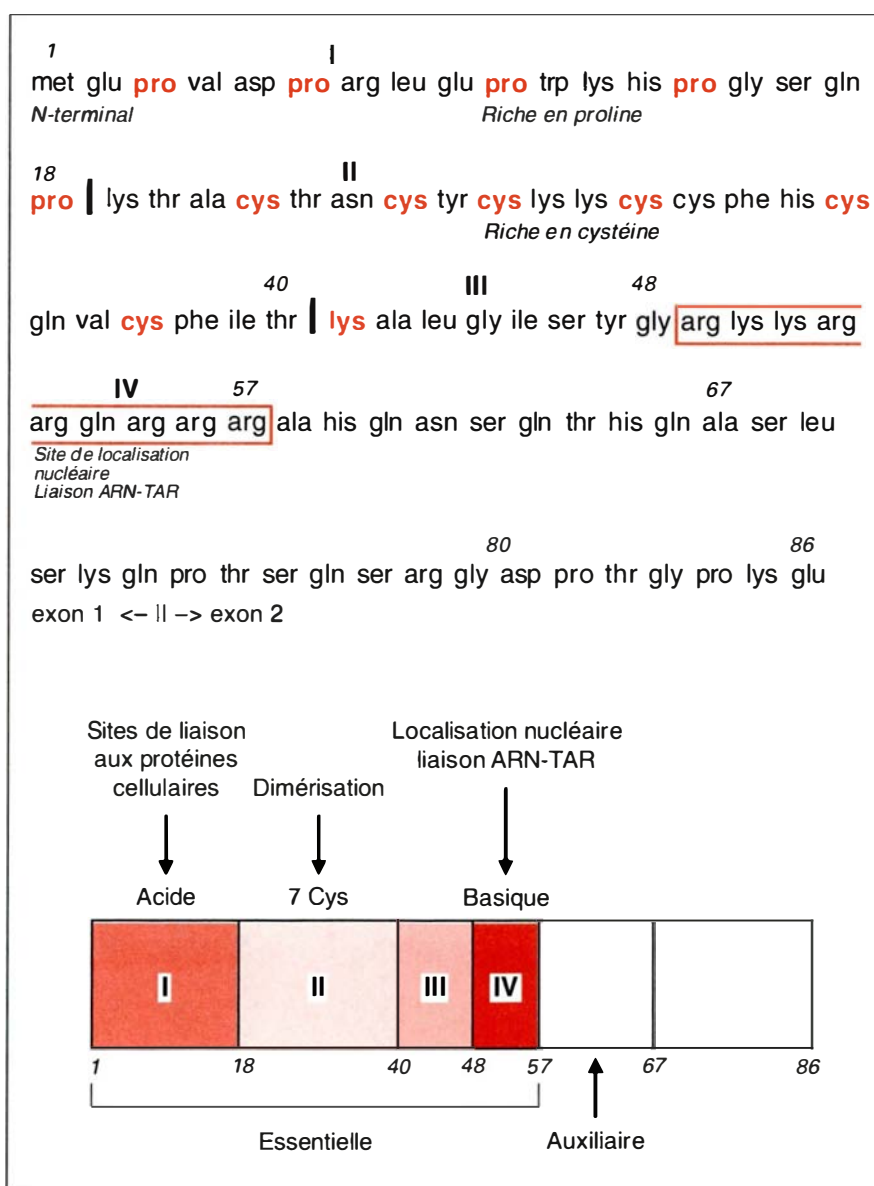


Figure 1. Structure primaire de la protéine Tat et ses différentes régions fonctionnelles.

RÉFÉRENCES

1. Haseltine WA. Regulation of HIV-1 replication by Tat and Rev. In: Haseltine WA, Wong-Staal FP, eds. *Genetic structure and regulation of HIV*. New York: Raven Press, 1991: 1-42.
2. Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the transactivator gene required for HTLV-III replication. *Science* 1985; 227: 171-3.
3. Ruben S, Perkins A, Purcell R, et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol* 1989; 63: 1-8.
4. Rosen CA. Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactions. *Trends Genet* 1991; 7: 9-14.
5. Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G. Multiple functional domains of Tat, the transactivator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3551-61.
6. Rice AP, Carlotti F. Structural analysis of wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1 Tat proteins. *J Virol* 1990; 64: 6018-26.
7. Nelbock P, Dillon PJ, Perkins A, Rosen CA. A cDNA for a protein that interacts with the human immunodeficiency virus Tat transactivator. *Science* 1990; 248: 1650-3.
8. Marciniak RA, Calnan BJ, Frankel AD, Sharp PA. HIV Tat protein *trans*-activates transcription *in vitro*. *Cell* 1990; 63: 791-802.
9. Frankel AD, Bredt DS, Pabo CO. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* 1988; 240: 70-3.
10. Cordingley MG, La Femina RI, Callahan PL, et al. Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8985-9.
11. Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* 1990; 249: 1281-5.
12. Weeks KM, Crothers DM. RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove? *Cell* 1991; 66: 577-88.
13. Karn J, Graeble MA. New insights into the mechanism of HIV-1 *trans*-activation. *Trends Genet* 1992; 8: 365-8.
14. Tao J, Frankel AD. Specific binding of arginin to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2723-6.
15. Churcher MJ, Lamont C, Hamy F, et al. High affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem and amino acid residues flanking the basic region. *J Mol Biol* 1993; 230: 90-110.

saire à l'activité de Tat et la protéine sous forme monomérique possède aussi une activité *trans*-activatrice.

La région III (acides aminés 41-48) est essentielle puisque sa suppression rend la protéine inactive. Sa fonction est encore mal connue. Elle présente un motif LysX Leu Gly Ile X Tyr dans lequel le résidu lysine est indispensable pour la *trans*-activation [6].

La région IV (acides aminés 49-57) est une région basique formée d'acides aminés chargés positivement. Elle aurait deux fonctions essentielles: permettre le transport de la protéine du cytoplasme vers le noyau [3] et permettre l'interaction de Tat avec la séquence TAR du LTR viral [10, 11].

La région auxiliaire (acides aminés 58-67), dont la suppression entraîne une diminution de la *trans*-activation, pourrait contribuer à la stabilisation de la molécule ou fournir, par l'intermédiaire de trois résidus Gln, une contribution directe à la *trans*-activation [5].

Mécanisme d'action de la protéine Tat

La *trans*-activation de l'expression du VIH par la protéine Tat fait suite à la formation d'un complexe avec la région TAR, séquence d'ARN ayant une structure spécifique et présente à l'extrémité 5' de tous les ARN viraux. La séquence ARN TAR reconnue par Tat comprend les nucléotides +19 à +42 et forme une structure stable en épingle à cheveu comprenant notamment une boucle de 6 nucléotides (30-35), un renflement de 3 nucléotides (23-25) et une tige de 8 paires de bases (*figure 2*). La région renflée, riche en uridine, entraîne une courbure de la tige et introduit un élargissement du sillon principal de l'hélice [12]. Des études de liaison de peptides ont montré que le renflement de 3 nucléotides riches en U et les 5 paires de bases adjacentes sont essentiels pour la liaison de Tat [11, 12]. L'uridine 23 du renflement est nécessaire à la formation du complexe nucléoprotéique; intervient également dans la liaison à Tat deux bases situées immédiatement au-dessus du renflement (G 26 et

A27). En effet, soit en bloquant la position N3 de U23, soit en remplaçant G26 et A27 par 7-déaza-dG et 7-déaza-dA, il a été constaté une absence de liaison entre Tat et TAR [13]; ces résultats suggèrent que l'interaction entre Tat et les bases de TAR précitées met en jeu des liaisons hydrogènes. La protéine Tat viendrait se positionner sur le renflement U23-C24-U25 de TAR par l'intermédiaire de la région fortement basique (*figure 2*). Il s'établirait des liaisons hydrogène entre un résidu arginine de la protéine Tat et des groupements phosphates situés

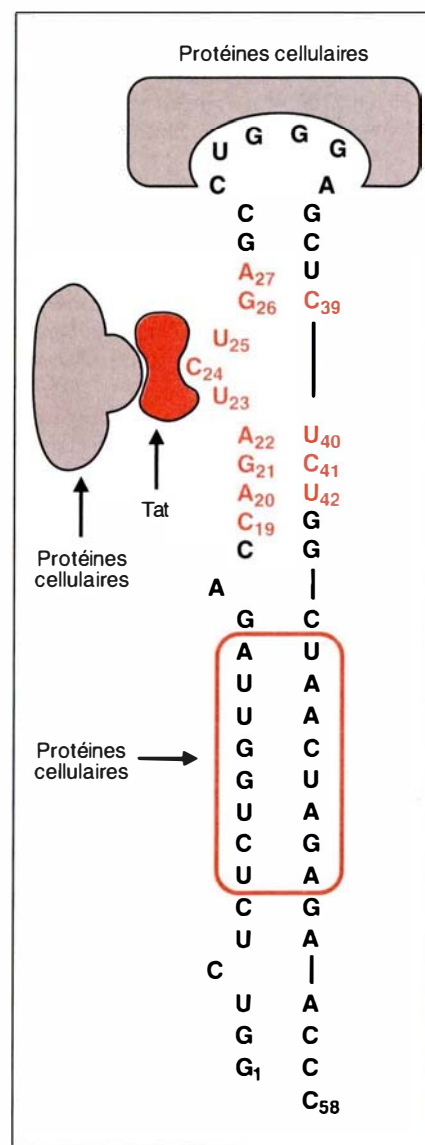


Figure 2. Structure de la région ARN TAR, interactions Tat-TAR-protéines cellulaires.

entre les paires de bases G21-A22 et A22-U23 ainsi qu'avec G26, elle-même liée à A27 [12, 14] (figures 3 et 6). Récemment, des mesures quantitatives de constantes d'affinité ont confirmé l'importance de ces nucléotides et des groupements phosphates pour la spécificité de liaison à Tat [15]. Ce travail montre en outre que, parmi les contacts qui interviennent dans la spécificité de liaison Tat-TAR, la région N-adjacente au domaine basique de la protéine Tat est particulièrement importante. Par ailleurs, des mutations de nucléotides au niveau de la

boucle de TAR n'affectent pas la liaison de Tat ou de peptides poly-basiques mais entraînent une diminution de la *trans*-activation [10]. La *trans*-activation nécessite donc l'intervention de cofacteurs cellulaires qui se lient à la boucle de l'ARN TAR (figure 2). Un certain nombre de protéines cellulaires se liant à TAR ont maintenant été identifiées mais leur rôle est encore mal défini [8, 16-18]. La *trans*-activation par Tat requiert deux fonctions :

- une fonction de ciblage, réalisée par la liaison de Tat à TAR : des expériences de mutagenèse dirigée

ont montré qu'une fonction essentielle de l'ARN TAR est de positionner Tat à proximité du complexe de transcription [19] ;

- une fonction d'activation impliquant un domaine fonctionnel qui interagit avec le complexe de transcription [8]. La protéine Tat augmente à la fois l'initiation de la transcription et l'efficacité d'élongation des ARN transcrits [18]. La transcription à partir du LTR est initiée par la liaison de facteurs de transcription cellulaires et de l'ARN polymérase au LTR du provirus. En l'absence de Tat, la plupart des transcrits viraux produits sont de courtes molécules d'ARN de 60 à 80 nucléotides et la plupart des ARN-polymérase engagées dans la transcription restent dans la région du promoteur. En présence de Tat, l'efficacité d'élongation est largement augmentée et la densité des ARN-polymérase en aval du promoteur est accrue de manière notable [8, 21, 22].

Un modèle en six étapes, résumant le mécanisme de la transcription à partir du LTR viral, a récemment été proposé par Karn et Greable [13] (figure 4). Ce modèle très schématique comporte encore bien des incertitudes, concernant en particulier la nécessité de la présence de TAR pour stabiliser le complexe d'initiation, le rôle des protéines cellulaires qui se lient à l'ADN dans la région TAR et le rôle des cofacteurs cellulaires se liant à Tat et/ou à TAR.

L'interaction Tat-TAR, nécessaire à la *trans*-activation n'est cependant pas suffisante. Nous venons de voir que des protéines cellulaires au rôle déterminant sont également impliquées. En effet, le LTR contient plusieurs domaines de régulation servant de sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires. Parmi ceux-ci, le facteur NF- κ B possède un rôle tout à fait particulier puisque son activité est induite lors de l'activation des lymphocytes. Il est au centre d'un système complexe d'interactions, notamment avec l'expression des gènes des cytokines [23]. Il est bien évident que ces facteurs de transcription cellulaires et la protéine *trans*-activatrice virale sont impliqués ensemble dans l'aug-

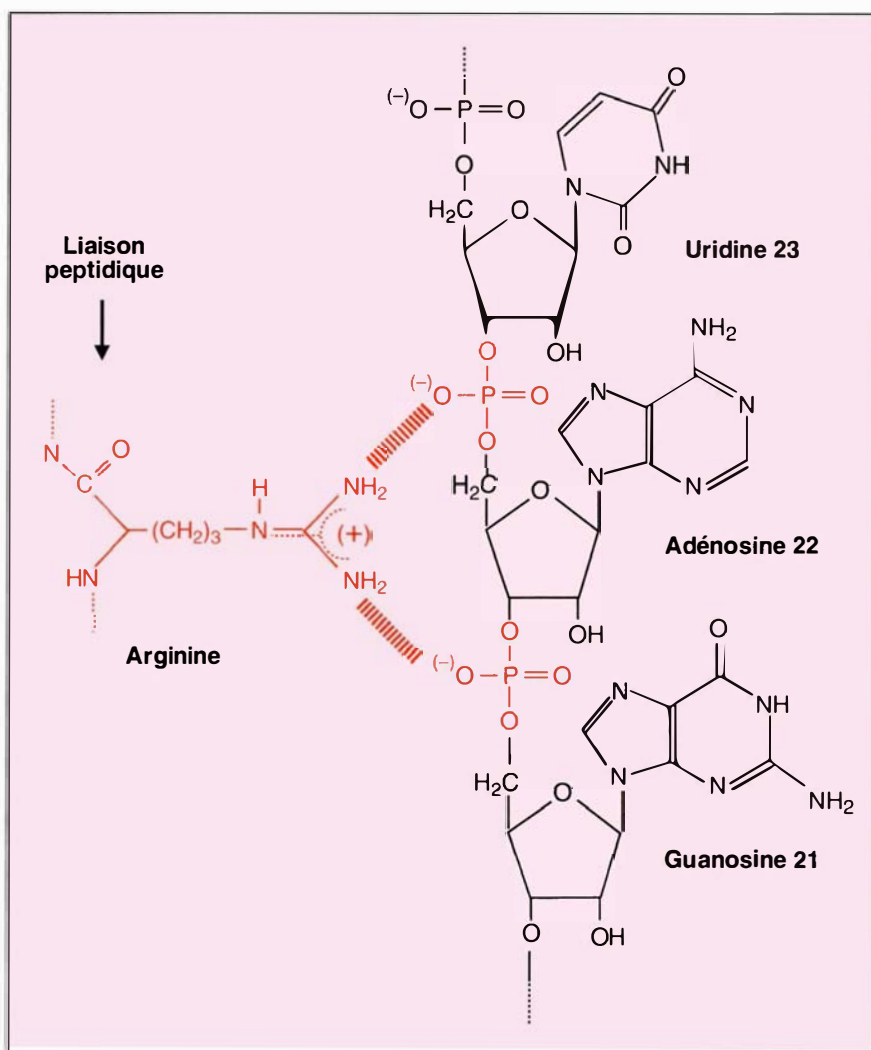


Figure 3. **Interaction d'un résidu arginine de Tat avec TAR.** Des liaisons hydrogène (en hachures rouges) s'établissent entre un résidu arginine de la protéine Tat et les groupes phosphates situés entre les bases G21-A22 et A22-U23.

RÉFÉRENCES

16. Gatignol A, Kumar A, Rabson A, Jeang KT. Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 *trans*-activation-responsive TAR element RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7828-32.
17. Wu F, Garcia J, Sigman D, Gaynor R. TAT regulates binding of the human immunodeficiency virus *trans*-activating region RNA loop-binding protein TRP-185. *Genes Dev* 1991; 5: 2128-40.
18. Rounseville MP, Kumar A. Binding of a host cell nuclear protein to the stem region of human immunodeficiency virus type 1 *trans*-activation-responsive RNA. *J Virol* 1992; 66: 1688-94.
19. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, et al. HIV-1 Tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *Embo J* 1990; 9: 4145-53.
20. Cullen BR. The HIV Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell* 1990; 63: 655-7.
21. Laspias MF, Rice AP, Mathews MB. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* 1989; 59: 283-92.
22. Feinberg MB, Baltimore D, Franke AD. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4045-9.
23. Hiscott J, Roulston A, D'Addario M, Lacoste J, Cohen L. La régulation de l'expression de VIH-1 et l'activation des gènes de cytokines. *médecine/sciences* 1992; 8: 346-51.
24. Bagasra O, Khalili K, Seshamma T, Taylor P, Pomerantz RJ. TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells. *J Virol* 1992; 66: 7522-8.
25. Harrich D, Garcia J, Mitsuyasu R, Gaynor R. TAR independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester-stimulated T lymphocytes. *Embo J* 1990; 9: 4417-23.
26. Popik W, Pitha P. Role of tumor necrosis factor alpha in activation and replication of the *tat*-defective human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67: 1094-9.
27. Vogel J, Hinrichs SH, Reynolds RK, Luciw PA, Jay G. The HIV *tat* gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 1988; 335: 606-11.
28. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 1990; 345: 84-6.

mentation de l'expression du VIH et de sa réplication.

Notons enfin que, dans certains cas particuliers, l'expression virale peut exister en l'absence d'interaction Tat-TAR. Par exemple, la réplication de virus muté au niveau de TAR est possible dans certains types de cellules (cellules gliales, lymphocytes T stimulés) [24, 25]. Le TNF (*tumor necrosis factor*) peut, dans certaines conditions, induire l'expression de virus latents délétés du gène *tat*, que ce soit dans les cellules T ou dans les monocytes. Cette réplication virale en l'absence de Tat est cependant moins efficace [26]. Ainsi, les interactions entre le milieu cellulaire et la fonction de *tat* constituent la clef du contrôle de l'expression du virus.

Rôle de Tat dans la pathogénicité du virus

La protéine Tat, outre son rôle principal dans la réplication virale, est impliquée dans la régulation de certains processus cellulaires et intervient dans la pathogénicité du virus. Les souris transgéniques pour le gène *tat* présentent des lésions cutanées qui évoquent le sarcome de Kaposi [27], suggérant une contribution de la protéine Tat au développement de cette tumeur. La protéine Tat, libérée par des cellules infectées par le VIH ou transfectées par un plasmide exprimant Tat, est capable de stimuler la croissance des cellules de Kaposi isolées chez des patients atteints de SIDA et ce, à de très faibles concentrations, suggérant que cet effet est lié à l'interaction de Tat avec un récepteur membranaire probablement de la famille des intégrines [28, 29]. Plusieurs observations démontrent les interactions entre la protéine Tat et le réseau de cytokines. La protéine Tat, libérée dans le milieu extracellulaire *in vitro*, peut être transportée jusqu'au noyau des cellules non infectées [30]. Tat est capable de stimuler la production de cytokines telles que le TNF ou le TGF β (*transforming growth factor* β) [31]. La protéine Tat, en coopération avec les cytokines libérées par les cellules T activées, est donc fortement

impliquée dans la pathogénie du sarcome de Kaposi [32].

Des propriétés immunosuppressives de la protéine Tat ont été décrites : l'addition de Tat à des lymphocytes en culture inhibe la prolifération des cellules soumises à une stimulation antigénique [33], mais cette action ne peut être démontrée qu'en l'absence de cellules accessoires [34] ; il est donc difficile de préjuger du réel effet immunosuppresseur de Tat *in vivo*.

Tat pourrait jouer un rôle dans la neuropathologie liée à l'infection par le VIH. L'addition de peptides synthétiques correspondant à Tat augmente la perméabilité membranaire de cellules nerveuses en culture et leur injection intracérébrale chez la souris induit des effets létaux ou toxiques [35]. Dans les cellules gliales en culture, la protéine Tat est capable d'activer la transcription et d'augmenter la production des ARN de fibronectine et de collagène et, à un moindre degré, la production de ces protéines. Cette activation pourrait être liée, soit à une action directe sur les promoteurs de ces gènes, soit à un effet indirect par l'activation de l'expression du TGF- β , activateur connu de l'expression des gènes des protéines de matrice [36].

Tat augmente aussi la réplication d'autres virus par son action sur des promoteurs viraux hétérologues. L'expression de Tat accroît l'expression des gènes précoce et tardif du cytomégalovirus humain ainsi que sa réplication [37]. Il faut noter que la *trans*-activation par Tat du promoteur principal précoce du cytomégalovirus murin s'exerce indépendamment de TAR. L'effet de Tat, observé à la fois sur la transcription et la traduction, serait dû à des interactions entre Tat et différentes régions de l'ADN viral [38]. La protéine Tat *trans*-active également le promoteur tardif du virus JC. Dans ce cas, la *trans*-activation est liée à la présence d'une séquence d'ARN dans la région 5' de ce promoteur, présentant une forte homologie avec la séquence TAR du VIH [39].

Ainsi, la protéine Tat se trouve au centre de mécanismes de régulation qui amplifient l'expression du VIH, interrompent la latence virale, aug-

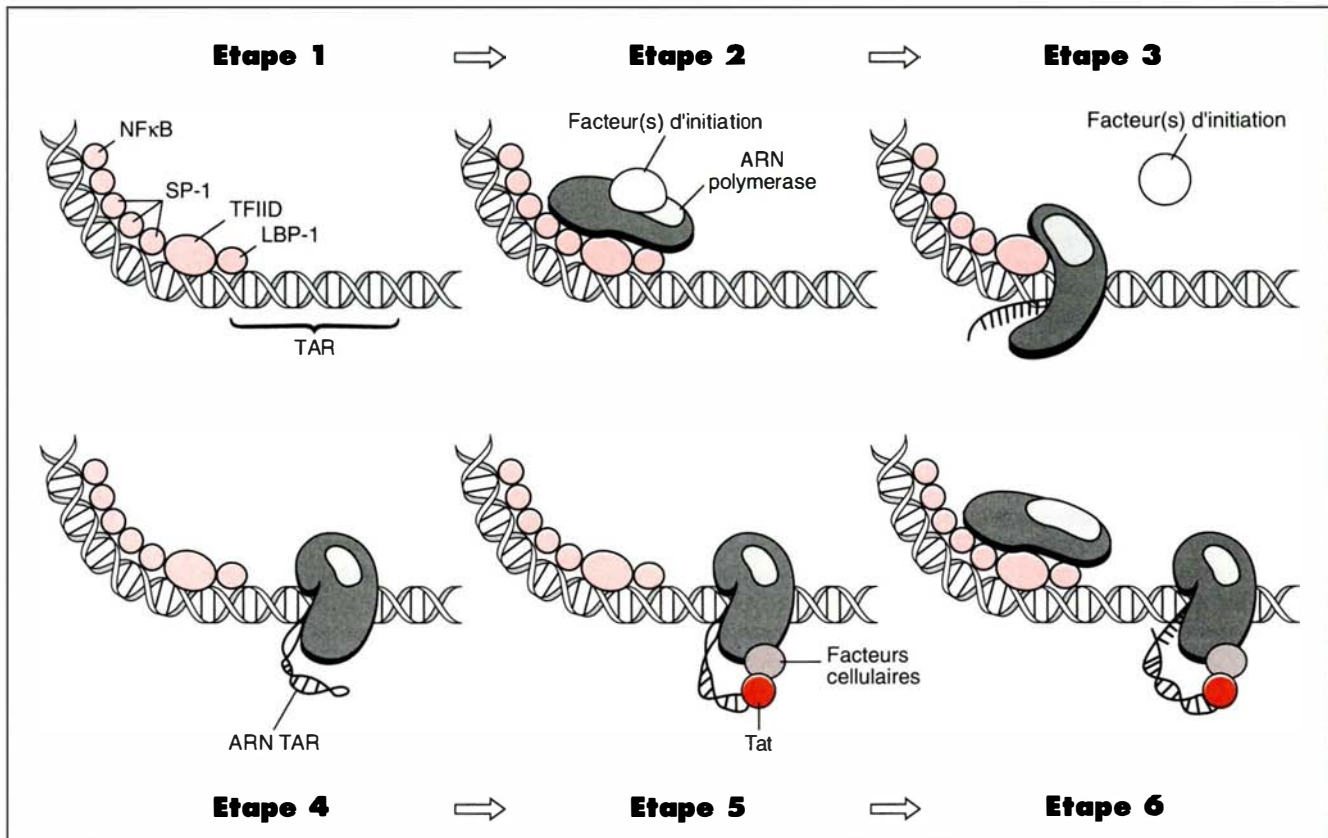


Figure 4. **Modèle de contrôle de la transcription par Tat 1.** Les facteurs de transcription cellulaires se lient au LTR proviral 5'. 2. L'ARN polymérase, liée aux facteurs d'initiation, forme un complexe avec la séquence promoteur de l'ADN. 3. Après l'initiation de la transcription et la polymérisation des premiers nucléotides de la chaîne d'ARN, un changement conformationnel de l'ARN polymérase entraîne la libération des facteurs d'initiation. 4. Après la transcription de l'ARN TAR, le fonctionnement de la polymérase s'arrête. 5. Tat et les facteurs d'élongation s'assemblent à la surface de l'enzyme pour créer un complexe de transcription modifié qui devient capable de transcrire efficacement la partie restante du génome. En l'absence de Tat, les facteurs d'élongation nécessaires ne sont pas recrutés et l'ARN polymérase, devenue instable, se désolidarise de la matrice à une courte distance de TAR. 6. Le complexe de transcription s'éloigne de TAR et une nouvelle ARN polymérase peut initier la transcription. (D'après [13].)

mentent la dissémination du virus et l'importance des phénomènes pathologiques.

Stratégies permettant d'obtenir des inhibiteurs de Tat

Actuellement, la mise au point des inhibiteurs de Tat apparaît comme plus difficile que celle des inhibiteurs de la transcriptase inverse ou de la protéase dont les mécanismes d'action sont mieux cernés. Cependant, le criblage de molécules utilisant des tests simples de mise en évidence de la *trans*-activation par Tat a déjà permis d'identifier des molécules antagonistes de Tat capables d'inhiber la réplication virale.

m/s n° 12 vol. 9, décembre 93

D'autre part, la connaissance actuelle des caractéristiques de la liaison Tat-TAR et des mécanismes de l'action de Tat doit permettre la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs.

Criblage de molécules à l'aveugle

La détermination de l'activité *trans*-activatrice de la protéine Tat par la mesure de l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des séquences régulatrices LTR du VIH a permis de mettre au point des tests simples de criblage de molécules antagonistes de la fonction de Tat [40]. Cette méthodologie permet la sélection de composés

capables d'inhiber la sécrétion du produit d'un gène indicateur soumis au double contrôle du LTR du VIH et de Tat. Après co-transfection de cellules eucaryotes par deux types de plasmides, l'un contenant un gène rapporteur sous le contrôle du LTR du VIH, l'autre exprimant la protéine Tat, il est possible de déterminer la concentration de protéine synthétisée à partir du gène rapporteur en présence de concentrations variables de la molécule à tester. Plusieurs types de gènes rapporteurs ont été utilisés tels que l'acétyltransférase du chloramphénicol (CAT), la luciférase [41], ou la phosphatase alcaline [42]. Il est également possible d'utiliser des cellules exprimant le gène rapporteur de

RÉFÉRENCES

29. Ensoli B, Buonaguro I, Barillari G, *et al.* Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 1993; 67: 277-87.
30. Helland DE, Welles JL, Caputo A, Haseltine WA. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 *tat* protein. *J Virol* 1991; 65: 547-9.
31. Buonaguro I, Barillari G, Chang HK, *et al.* Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol* 1992; 66: 7159-67.
32. Barillari G, Buonaguro I, Fiorelli V, *et al.* Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV gene expression. Implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Immunol* 1992; 149: 3727-34.
33. Viscidi RP, Mayur K, Lederman HM, Frankel AD. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 1989; 246: 1606-8.
34. Meyaard I, Otto SA, Schuitemaker H, Miedema F. Effects of HIV-1 Tat protein on human T cell proliferation. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2729-32.
35. Sabatier JM, Vives F, Mabrouk K, *et al.* Evidence for neurotoxic activity of *tat* from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1991; 65: 961-7.
36. Taylor JP, Cupp C, Diaz A, *et al.* Activation of expression of genes coding for extracellular matrix proteins in Tat-producing glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9617-21.
37. Ho WZ, Ayyavoo V, Srinivasan A, Stinski MF, Plotkin SA, Gönczöl E. Human immunodeficiency virus type 1 *tat* gene enhances human cytomegalovirus gene expression and viral replication. *Aids Res Hum Retrovir* 1991; 7: 689-95.
38. Kim YS, Risser R. TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter by the Tat protein. *J Virol* 1993; 67: 239-48.
39. Chowdhury M, Taylor P, Chang CF, Rappaport J, Khalili K. Evidence that a sequence similar to TAR is important for induction of the JC virus late promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol* 1992; 66: 7355-61.
40. Felber B, Pavlakis GN. A quantitative bioassay for HIV-1 based on *trans*-activation. *Science* 1988; 239: 184-7.
41. Schwartz O, Virelizier JL, Montagnier L, Hazan U. A microtransfection reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene* 1990; 88: 197-205.
- manière constitutive. De nouveaux tests examinant la liaison de Tat à TAR dans un milieu acellulaire devraient pouvoir être développés [19]. Un test direct d'inhibition de la liaison Tat-TAR fournirait un modèle permettant une étude approfondie de l'interaction entre Tat et sa cible. En 1991, Hsu *et al.* [42, 43] ont décrit l'activité antivirale d'une molécule antagoniste de la fonction de Tat appartenant à la famille des benzodiazépines, le Ro 5-3335 (figure 5). Cette molécule inhibe l'expression de gènes placés sous le contrôle du LTR du VIH *trans*-activée par Tat. Cette inhibition est spécifique de l'action de Tat puisque la présence de la molécule ne modifie pas l'activité de base du LTR et n'inhibe pas l'expression de gènes placés sous le contrôle d'un autre promoteur. Le Ro-5-3335 inhibe la réplication du VIH (concentration inhibitrice 50 % = 0,1-1 μ M), aussi bien dans des cellules en culture après une infection aiguë que dans des lignées cellulaires chroniquement infectées. Il est capable d'inhiber la réplication d'isolats différents de VIH-1 et VIH-2, de même que celle de souches résistantes à l'AZT, et possède une synergie d'action avec l'AZT. Le Ro-5-3335 n'inhibe pas l'activité enzymatique de la transcriptase inverse; son site d'action est donc différent de celui des TIBO, autre classe de molécules de la famille des benzodiazépines [44]. Le mécanisme d'action du Ro 5-3335 au niveau moléculaire n'est pas

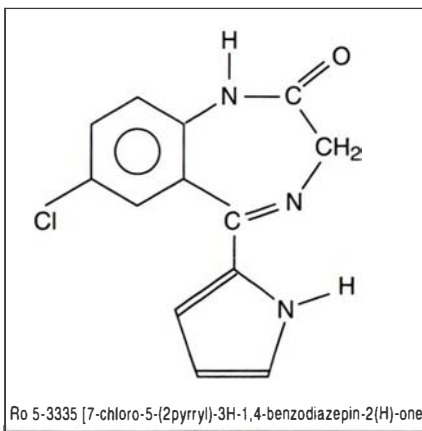


Figure 5. **Structure chimique de la benzodiazépine Ro 5-3335.**

encore élucidé et la capacité de ce produit d'inhiber la protéine Tat devrait être confirmée dans des systèmes acellulaires. Cependant, contrastant avec l'activité des inhibiteurs de transcriptase inverse ou de protéase qui empêchent la formation de nouveaux cycles d'infection, cet antagoniste de Tat inhibe la réplication du VIH à partir du provirus intégré [45]. Cette classe de molécules est également capable d'inhiber certains effets pathologiques des protéines du VIH nouvellement synthétisées. En effet, il a été récemment démontré que le Ro 5-3335 induit une augmentation de l'expression des récepteurs CD4 à la membrane des cellules T en même temps qu'une diminution de la production virale [46]. Ces résultats suggèrent donc que le Ro 5-3335 est capable de restaurer les capacités fonctionnelles des cellules T.

Les études chez l'animal ont orienté le développement d'un dérivé moins toxique et pouvant être administré par voie orale (Ro 24-7429). En 1992, ce composé a fait l'objet d'un premier essai clinique incluant la tolérance, l'impact immunologique (nombre de CD4) et virologique (Ag p24, culture) comme critères d'évaluation. Les résultats préliminaires de cet essai, présentés à la IX^e Conférence Internationale sur le SIDA de Berlin [47], montrent une bonne tolérance; en revanche, aucun des marqueurs biologiques déjà évalués n'a été modifié aux trois doses administrées. Le développement de cette molécule par les laboratoires Roche a été interrompu. La méthodologie de criblage reste néanmoins productive et a permis la sélection d'autres composés stéroïdes capables d'inhiber la *trans*-activation par Tat.

Conception rationnelle des inhibiteurs de Tat

La *trans*-activation de l'expression du provirus implique la formation d'un complexe comprenant la protéine Tat, la séquence TAR et des protéines cellulaires. *A priori*, chacun de ces éléments peut être la cible des inhibiteurs. Cependant, une intervention sur les protéines cellulaires, et en particulier sur les facteurs

transcriptionnels de la famille NF- κ B, paraît difficile du fait du rôle essentiel de ces protéines dans la fonction des cellules. Trois approches peuvent néanmoins être envisagées: les oligonucléotides antisens, les pseudo-TAR et les pseudo-Tat, ces derniers empêchant la formation du complexe Tat-TAR.

Il est possible d'appliquer à la séquence TAR ou au gène Tat la méthodologie des oligonucléotides antisens et antigènes [48]. Des oligonucléotides qui se fixent au niveau de séquences spécifiques de l'ADN peuvent inhiber l'initiation et/ou l'élongation de la transcription en empêchant la liaison des facteurs de transcription. Les oligonucléotides peuvent également avoir pour cible le codon d'initiation de la traduction de l'ARN et induire un arrêt de la traduction. De plus, ils peuvent rompre la structure tridimensionnelle de l'ARN au niveau d'un site fonctionnel important tel que la structure tige-boucle de la séquence TAR. Deux mécanismes de clivage de l'ARN peuvent être envisagés: utilisation d'oligonucléotides conjugués à un chélateur de métaux réactifs à l'oxygène qui produisent des radicaux libres capables de cliver la liaison phosphodiester des riboses ou désoxyriboses; utilisation de molécules d'ARN catalytiques ou ribozymes qui coupent les liaisons phosphodiesters au niveau de séquences spécifiques d'ARN.

La possibilité d'inhiber la réplication du VIH par des oligonucléotides antisens dans des cellules récemment ou chroniquement infectées a été explorée par Agrawal *et al.* [49]; l'efficacité des phosphorothioates s'est révélée supérieure à celle de leurs oligomères analogues non modifiés. La synthèse d'une série d'oligonucléotides pouvant se lier à la structure tige-boucle de TAR et la cliver a permis d'inhiber efficacement l'expression d'un gène rapporteur [50]. Récemment, Steve *et al.* [51] ont observé une inhibition de la production du VIH aussi bien dans des cellules produisant un ribozyme anti-Tat que dans celles qui produisent un oligonucléotide antisens dirigé contre *tat*.

Ces approches thérapeutiques se heurtent cependant à d'importantes

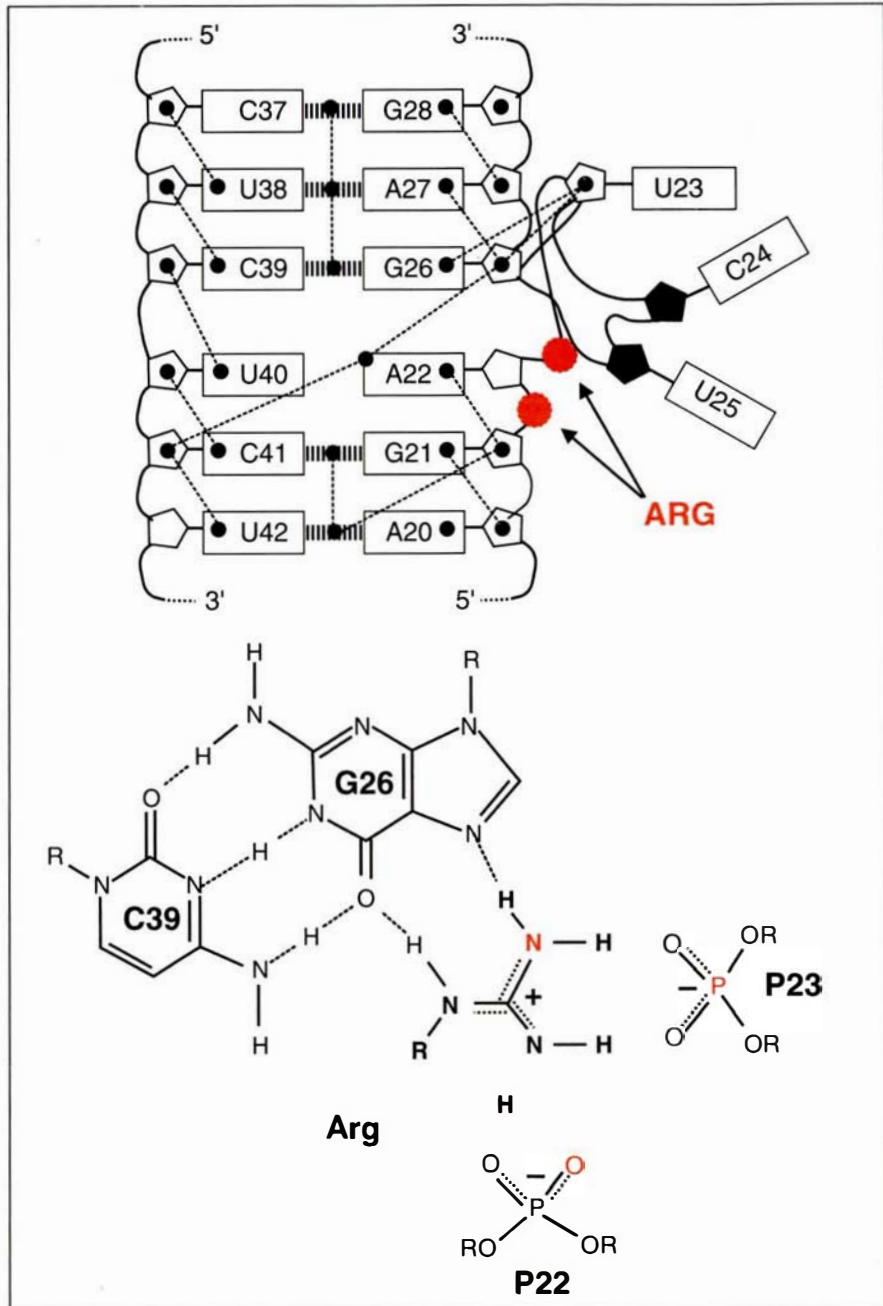


Figure 6. **Interactions d'un résidu arginine de Tat avec TAR extériorisant U23 et C24.** Les deux groupements phosphate des nucléotides 22 et 23 (en rouge) sont situés en amont du renflement à trois nucléotides UCU de TAR et établissent des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale d'un résidu arginine du nonapeptide de Tat qui se lie à TAR. L'interaction se fait aussi entre l'arginine et G26, lui-même uni à C39. (D'après [53].)

RÉFÉRENCES

42. Hsu MC, Schutt AD, Holly M, *et al.* Inhibition of HIV replication in acute and chronic infections *in vitro* by a Tat antagonist. *Science* 1991 ; 254 : 1799-802.
43. Guedj R. A propos des inhibiteurs de la protéine Tat : cible moléculaire de choix dans l'inhibition de la réplication du HIV. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 281-2.
44. Pauwels R, Andries K, Desmyter, *et al.* Potent and selective inhibition of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* 1990 ; 343 : 470-4.
45. Potash MJ, Bentsman G, McKinley G, Volsky DJ. A Tat antagonist inhibits HIV-1 induction in naturally infected and experimentally infected T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 189 : 250-6.
46. Shahabuddin M, Volsky B, Hsu MS, Volsky DJ. Restoration of cell surface CD4 expression in HIV-1 infected cells by treatment with the Tat inhibitor, Ro 5-3335. *J Virol* 1992 ; 66 : 6802-5.
47. Haubrich RH, and the ACTG 213 team. A randomized study of safety, tolerance, pharmacokinetics, and activity of oral Ro-24-7429 (tat antagonist) in patients with HIV infection. *IXth International Conference on AIDS*, 1993, Abstract WS-B26-5, Berlin June 6-11.
48. Helene C, Thuong NT. Le contrôle artificiel de l'expression des gènes. *Pour la Science* 1990 ; 151 : 38-46.
49. Agrawal S, Ikeuchi T, Sun D, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus in early infected and chronically infected cells by antisense oligodeoxynucleotides and their phosphorothioate analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7790-4.
50. Vickers T, Baker BF, Cook PD, *et al.* Inhibition of HIV-1 LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 3359-68.
51. Steve KM, Biasolo MA, Dehni G, Palù G, Haseltine WA. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing *tat*-antisense and anti-*tat* ribozyme RNA. *Virology* 1992 ; 190 : 176-83.
52. Lisiewicz J, Rappaport J, Dhar R. Tat-regulated production of multimerized TAR RNA inhibits HIV-1 gene expression. *N Biol* 1991 ; 3 : 82-9.
53. Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-Arginine complex by NMR Spectroscopy. *Science* 1992 ; 257 : 76-80.
54. Jayasena SD, Johnston BH. Site-specific cleavage of the transactivation response site of human immunodeficiency virus RNA with a *tat*-based chemical nuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 3526-30.
- difficultés. Pour obtenir une activité antivirale satisfaisante, les oligonucléotides doivent être présents dans les cellules à une concentration assez élevée et avoir une durée de vie suffisante. Des problèmes importants, tels que la dégradation des oligonucléotides par les endonucléases, la pénétration cellulaire et la stabilité dans la cellule, ne sont encore que partiellement résolus.
- L'introduction dans la cellule de molécules pseudo-TAR permet de séquestrer la protéine Tat et de l'empêcher d'atteindre sa cible. Il est possible de rendre des cellules résistantes à la réplication du VIH par l'introduction d'un gène protecteur induisant une surexpression de l'ARN TAR [52]. La transfection de cellules avec un plasmide exprimant TAR sous le contrôle du LTR entraîne une diminution de l'expression du VIH qui dépend de la concentration du poly-TAR transfecté. L'insertion d'un gène LTR-50 TAR dans un vecteur rétroviral et l'infection par ce vecteur de cellules infectées par le VIH entraînent une diminution de la production virale. Une autre approche possible serait la synthèse chimique de molécules pseudo-TAR qui joueraient le rôle d'inhibiteurs compétitifs de Tat.
- Des molécules dont la structure est basée en partie sur celle de Tat peuvent entrer en compétition avec Tat pour se lier à TAR et devenir ainsi des agents antiviraux potentiels. Nous avons vu que la région fortement basique de Tat, nonapeptide comprenant les acides aminés 49-57, comporte la séquence qui permet la localisation de Tat au noyau, et se lie sur un site particulier de la séquence TAR. Des liaisons hydrogène s'établiraient entre la chaîne latérale d'un résidu arginine du peptide et les groupements phosphates situés entre les paires de bases G21-A22 et A22-U23 situées en amont du renflement à trois nucléotides UCU de TAR ; les lysines situées à proximité de l'arginine permettraient de stabiliser la liaison entre le peptide et TAR. L'interaction entre le résidu Arg et la séquence nucléotidique s'effectue non seulement avec les deux groupements phosphates P22 et P23 mais aussi avec G26, lui-même uni à C39 (figure 6). Cette interaction de l'arginine avec TAR étant stabilisée par cette triple connexion, il est possible d'imaginer des inhibiteurs de la liaison Tat-TAR, d'autant que les deux nucléotides U25 et C24 non engagés dans des liaisons nucléotidiques intracaténaïres ainsi que les deux groupements phosphates impliqués sont extériorisés par rapport à la structure de TAR [53].
- Ainsi, des peptides plus courts qu'un nonapeptide, mais, surtout, des nucléopeptides possédant des structures du type Arg-bras intercalant-A-G, capables de former des liaisons hydrogène avec TAR, pourraient jouer le rôle d'inhibiteurs compétitifs de la fixation de Tat sur TAR. En effet, en se fixant sur TAR, l'arginine du nucléopeptide permettrait l'extériorisation des deux bases U25 et C24 et la fixation des deux bases complémentaires sur celles-ci. De la même manière, des fragments peptidiques contenant le site de localisation nucléaire de Tat et capables de se lier à TAR peuvent être utilisés pour réaliser une coupure spécifique au niveau de l'ARN du VIH par un autre moyen que l'utilisation de ribozymes. De telles nucléases, réalisées par le couplage d'un peptide Tat et d'une phénanthroline, ont été récemment synthétisées [54].
- La possibilité de supprimer la localisation nucléaire de la protéine pourrait constituer une autre possibilité d'intervention thérapeutique. Des peptides contenant le motif de localisation nucléaire sont capables, en théorie, d'entrer en compétition avec les protéines cellulaires qui se lient à Tat et permettent son transport jusqu'au noyau.
- Il reste évidemment nécessaire, après la synthèse de molécules conçues selon ces bases théoriques, de vérifier expérimentalement leur activité, ce qui fournirait également une confirmation expérimentale du modèle de liaison Tat-TAR sur lequel s'appuie cette approche et dans laquelle l'arginine joue un rôle considérable.

Conclusion

La protéine de *trans*-activation Tat présente une cible particulièrement

intéressante dans le contexte de la chimiothérapie antirétrovirale car elle joue un rôle déterminant dans les phénomènes d'activation virale qui permettent l'expression des gènes viraux. Les antagonistes de Tat seraient des antiviraux particulièrement spécifiques puisqu'il n'existe pas de protéine cellulaire homologue ; ils devraient supprimer efficacement la transcription du génome viral et bloquer la formation de nouvelles protéines virales et de nouveaux virions sans modifier les fonctions cellulaires. Agir à ce stade du cycle de réplication viral paraît particulièrement intéressant puisque, en théorie, l'expression de toutes les protéines virales serait inhibée. On peut s'attendre à ce que les antagonistes de Tat soient capables de diminuer certains effets pathogènes du virus, tels que la neurotoxicité, l'immunodépression ou la stimulation de croissance des cellules de Kaposi. En outre, dans des conditions similaires à celles qui induisent une résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse, il n'a pas été observé *in vitro* de résistance aux antagonistes de Tat. Enfin, il nous paraît très important, compte tenu du grand intérêt des associations thérapeutiques dans le traitement de l'infection par le VIH et du nombre assez limité de molécules actives, de disposer de nouvelles molécules possédant un site d'action différent de celles déjà utilisées.

Deux approches sont intéressantes pour permettre le développement de molécules antivirales ciblées sur Tat. D'une part, le développement de tests automatisés permettant de déterminer la *trans*-activation par Tat offre la possibilité de tester de nombreuses molécules et a déjà permis d'identifier des produits possédant une activité antivirale et utilisables en clinique. L'identification de ces produits rend possible la synthèse systématique de molécules dérivées. D'autre part, les connaissances acquises sur la structure et les mécanismes d'action de Tat, bien qu'encore incomplètes, permettent de concevoir des antagonistes de Tat à partir de bases théoriques. De plus, la synthèse de ces molécules devrait permettre d'approfondir la connaissance de la fonction de Tat, de ses interactions et de son mécanisme d'action ■

Remerciements

Le travail pluridisciplinaire que nous réalisons sur les inhibiteurs de la fonction Tat bénéficie du soutien financier de l'Agence nationale de recherches sur le Sida (ANRS) et des contacts fructueux établis au cours des réunions scientifiques organisées par son directeur, Pr Jean-Paul Lévy.

Summary

Tat protein from HIV: a potential molecular target for antiretroviral chemotherapy

The human immunodeficiency virus (HIV) encodes numerous regulatory proteins among which Tat and Rev are essential for virus replication. These proteins control HIV gene expression through interaction with specific regions of the viral RNA. The central role of the Tat protein in transforming HIV from a latent to an infective state makes it an attractive target for antiviral chemotherapy. This review summarizes the current knowledge on the structure and molecular characterization of Tat as well as its pivotal role in virus replication and its contribution to virus pathogenesis. The strategies which have already been applied and possible future approaches to identify the specific inhibitors of the function of this critical viral protein are described.

TIRÉS A PART

R. Guedj.