

La protéine trans-activatrice Tat de HIV-1 : cible potentielle pour les agents antiviraux

Le virus d'immunodéficience humaine de type I (HIV-1) appartient à la famille des lentivirus. Ces rétrovirus non transformants causent une dégénérescence progressive des systèmes nerveux et immunitaires. Outre l'absence d'activité cancérogène, les lentivirus se distinguent des rétrovirus transformants au niveau de leur organisation génétique. En effet, leur génome contient, en plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, de petits cadres de lecture qui codent pour les protéines régulatrices de l'expression génique virale.

La réplication de HIV-1 nécessite la présence de deux de ces protéines régulatrices virales : Rev (voir *m/s* n° 6, vol. 5, p. 423) et Tat. La protéine Tat produit une activation *in trans* de l'expression génique virale. La séquence d'ADN requise pour la trans-activation par Tat (cette séquence est appelée TAR) se situe au niveau de la longue répétition terminale (LTR, *long terminal repeat*) de HIV-1. Comme dans le cas des autres rétrovirus, c'est au niveau de la séquence LTR que sont contenus les éléments de régulation de l'expression génique virale tels le promoteur, l'activateur de transcription (*enhancer*) et le site de polyadénylation. L'élucidation des mécanismes qui régissent la trans-activation par Tat est essentielle à la compréhension du contrôle du cycle de réplication de HIV-1 et ainsi ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, le rôle primordial de Tat dans l'expression génique virale suggère que cette protéine régulatrice pourrait servir de cible pour le développement d'agents antiviraux.

Le(s) mécanisme(s) de trans-activation. Bien que la nature du (ou des) mécanisme(s) de trans-activation par Tat ait fait l'objet de plusieurs études, elle n'en demeure pas moins controversée. L'approche expérimentale a été très simple. Des cellules sont co-transfectées avec un plasmide exprimant le gène *tat* et un plasmide exprimant un gène indicateur (tel que le gène de l'enzyme bactérienne chloramphénicol acétyltransférase [CAT] ou interleukine-2) sous le contrôle de la séquence LTR qui contient la région TAR. Le degré d'expression du gène indicateur (au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel) est mesuré et comparé à celui en absence de Tat. Plusieurs mécanismes de trans-activation ont été suggérés : (a) l'augmentation du taux d'initiation de la transcription [1]; (b) la prévention d'une terminaison précoce de la transcription (dit antiterminaison de la transcription) [2]; (c) l'augmentation de la stabilité des ARNm [3]; (d) l'augmentation de l'efficacité traductionnelle des ARNm [4-6].

L'importance relative de chacun des mécanismes décrits ci-dessus est probablement influencée par la stratégie expérimentale : type de cellule transfectée, nature des plasmides utilisés et/ou mode de transfection. Qu'une seule protéine puisse accomplir toutes ces fonctions est peu probable. Cependant, il n'est pas exclu que la trans-activation virale nécessite l'interaction de Tat avec des protéines cellulaires.

La séquence de reconnaissance TAR. Initialement, la région requise pour la trans-activation par Tat a été localisée entre les nucléotides -17 et +80

de la séquence LTR (+1 étant le site d'initiation de la transcription). Les séquences minimales requises pour la trans-activation ont été définies entre les nucléotides +18 et +44 [7]. Toutefois, il semble que des éléments structuraux en dehors de cette région contribuent aussi à la trans-activation [8]. La région TAR n'est fonctionnelle que si elle est positionnée correctement et dans la bonne orientation. Elle est présente dans la région non codante de tous les ARNm viraux et peut former une structure tige-boucle (aussi appelée structure en épingle à cheveux) entre les nucléotides +1 et +60 [3]. Cette structure pourrait être impliquée dans le contrôle de la traduction des ARNm viraux [9, 10]. De plus, elle est importante pour la trans-activation. La séquence nucléotidique dans la boucle [11] ainsi que la présence d'une petite boucle secondaire de trois nucléotides entre la position +23 et +25 [8] sont essentielles pour la fonction de TAR. Par ailleurs, la séquence primaire de la tige ne semble pas importante pour la trans-activation, puisque des mutations qui reconstituent l'appariement des bases n'affectent pas celle-ci [8]. Seule la présence d'une tige intacte serait nécessaire pour maintenir les deux boucles dans une configuration qui favorise l'interaction avec des facteurs cellulaires ou viraux (*figure 1*). Plusieurs facteurs cellulaires interagissant avec l'ADN TAR et l'ARN TAR ont été identifiés [12, 13]. De plus, deux groupes de chercheurs ont annoncé, lors de la 5^e conférence internationale sur le SIDA à Montréal, que la protéine Tat se lie directement à l'ARN TAR. L'importance

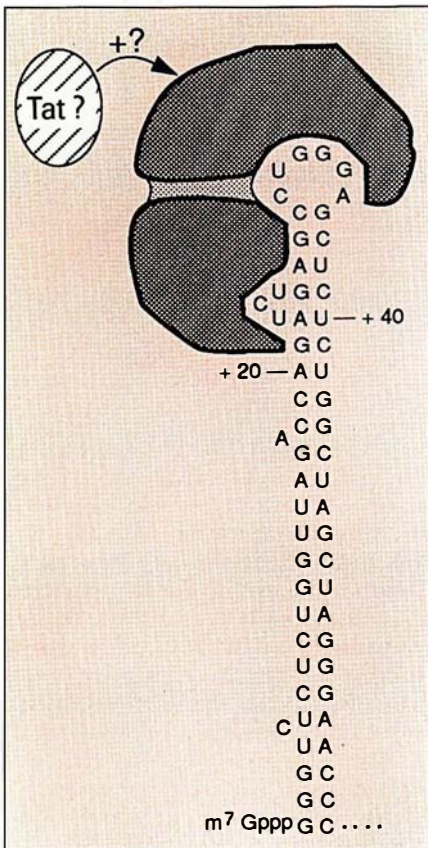


Figure 1. **Structure tige-boucle adoptée par l'ARN de la région TAR de HIV-1.** Des études antérieures ont démontré que la grande boucle (+ 30 à + 35) et la boucle secondaire (+ 23 à + 25) sont requises pour l'activité trans-activatrice de Tat. Ces deux structures pourraient servir de site d'interaction pour une ou plusieurs protéines jouant un rôle dans la trans-activation. Tat pourrait se lier directement à l'ARN TAR ou faciliter l'interaction de protéines cellulaires.

de ces interactions protéines-acides nucléiques sur la trans-activation reste cependant à évaluer.

La protéine trans-activatrice Tat. Tat est une protéine nucléaire constituée de 86 acides aminés (M_r 14 kDa) et codée par deux exons du génome viral. Seules les séquences du premier exon sont requises pour la trans-activation. Récemment, il a été démontré que la protéine purifiée ou synthétisée chimiquement peut, lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture, entrer dans les cellules et trans-activer l'expression de gènes possédant la séquence TAR [14, 15]. Cette

approche expérimentale a permis l'identification des séquences minimales nécessaires pour la fonction de Tat. La région N-terminale (acides aminés 1 à 37) contient sept cystéines qui se lient à des métaux divalents tels que le zinc ou le cadmium. Cette région est importante pour le repliement de la protéine et participe à la dimérisation de Tat. La deuxième région (acides aminés 38 à 48) a été définie comme la région requise pour la trans-activation. En effet, des peptides contenant des mutations dans la deuxième région agissent comme répresseurs trans-dominants de la fonction Tat [16]. Il a été suggéré que ces peptides bloquent l'interaction de la protéine Tat avec une cible de nature protéique ou nucléique encore non identifiée. La troisième région (acides aminés 49 à 57) contient huit lysines ou arginines et est donc extrêmement basique. Elle est requise pour la localisation de Tat dans le noyau. La quatrième région (acides aminés 58 à 72) est riche en glutamine et augmente l'activité trans-activatrice.

Conclusion : Tat joue un rôle essentiel dans la réplication de HIV-1. Son mécanisme d'action est encore controversé. L'identification du (ou des) mécanisme(s) impliqués devra probablement attendre le développement d'une approche expérimentale *in vitro* reproduisant la trans-activation par Tat. La protéine Tat peut être subdivisée en quatre régions : seule la deuxième (acides aminés 38 à 48) est nécessaire à l'activité trans-activatrice. La découverte récente de peptides agissant comme répresseurs trans-dominants de la fonction Tat ouvre la porte à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le développement d'agents antiviraux qui, comme ces répresseurs trans-dominants, bloquent l'interaction de la protéine Tat avec une cible encore inconnue offre un nouvel espoir dans la lutte contre le SIDA ■

**Sophie Roy
Charles Goyer
Neil T. Parkin**

Université Mc Gill, département de biochimie, Montréal, Québec, Canada.

RÉFÉRENCES

- Jeang KT, Shank PR, Kumar A. Transcriptional activation of homologous viral long terminal repeats by the human immunodeficiency virus type I or the human T-cell leukemia virus type I Tat proteins occurs in the absence of *de novo* protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8291-5.
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 1987; 330: 489-93.
- Muesing MA, Smith DH, Capon DJ. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus transactivator protein. *Cell* 1987; 48: 691-701.
- Cullen B. Transactivation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 1986; 46: 973-82.
- Braddock M, Chambers A, Wilson W, et al. HIV-1 Tat « activates » presynthesized RNA in the nucleus. *Cell* 1989; 58: 269-79.
- Rosen CA, Sodroski JG, Goh WC, Dayton AI, Lippke J, Haseltine WA. Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature* 1986; 319: 555-9.
- Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Human immunodeficiency virus type I LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J* 1989; 8: 765-78.
- Roy S, Parkin NT, Rosen CA, Itovitch J, Sonenberg N. Structural requirements for transactivation by Tat: importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the TAR region. Manuscrit en préparation.
- Parkin NT, Cohen EA, Darveau A, Rosen C, Haseltine W, Sonenberg N. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type I: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* 1988; 7: 2831-7.
- Ederly I, Petyshyn R, Sonenberg N. Activation of double-stranded RNA-dependent kinase (dsI) by the TAR region of HIV-1 mRNA: a novel translational control mechanism. *Cell* 1989; 56: 303-12.
- Feng S, Holland EC. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within TAR. *Nature* 1988; 334: 165-7.
- Jones KA, Luciw PA, Duchange N. Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev* 1988; 2: 1101-14.
- Gaynor RB, Soultanakis E, Kuwabara M, Garcia JA, Sigman DS. Specific binding of a HeLa cell nuclear protein to RNA sequences in the human immunodeficiency virus transactivating region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4858-62.
- Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 55: 1189-93.
- Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein. *Cell* 1988; 55: 1179-88.
- Green M, Ishino M, Loewenstein PM. Mutational analysis of HIV-1 tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* 1989; 58: 215-23.