

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SÉQUENCES LTR ET REV
IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE
L'EXPRESSION GÉNIQUE DU VIRUS DE
L'IMMUNODÉFICIENCE BOVINE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MIHAELA COJOCARIU

JUIN 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Denis Archambault pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de maîtrise dans son laboratoire à l'Université du Québec à Montréal. Je le remercie pour le soutien et l'appui qu'il m'a manifestés.

Un remerciement tout particulier à Marie Claude St-Louis pour ses conseils précieux et son apport important à l'organisation de cet ouvrage.

Un grand merci à ma famille qui m'a appuyé de loin dans toutes mes hésitations et mes joies. Cette expérience de vie m'a permis de m'enrichir sur le plan personnel et professionnel.

Merci encore au Dr Monique Boily pour son aide dans la partie d'analyse statistique de mes données, et aux Dr Martin Lessard et Dr Francois Ouellet pour la correction de ce mémoire.

Je remercie également l'Université du Québec à Montréal pour l'aide financière qu'elle m'a accordée pendant mes études universitaires.

Je remercie aussi tous les collègues de travail à l'UQAM que j'ai pu croiser pour leur courtoisie et leur sympathie.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Les lentivirus.....	4
1.2 Historique du VIB.....	5
1.3 Généralités sur le virus de l'immunodéficience bovine (VIB).....	6
1.3.1 Distribution et aspects pathologiques.....	6
1.3.2 Tropisme cellulaire <i>in vitro</i> et infectivité du VIB chez les hôtes hétérologues.....	7
1.3.3 Morphologie du VIB.....	8

1.3.4 Organisation génomique et régulation de l'expression génique du VIB.....	8
1.3.5 Le cycle de réplication du VIB.....	10
1.4 La protéine régulatrice de l'expression Tat du VIB et des autres lentivirus.....	13
1.5 La protéine Rev chez les lentivirus.....	17
1.6 Les autres protéines accessoires chez le VIB.....	19
1.7 La diversité génétique chez les rétrovirus.....	21
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
2.1. Diversité génétique et analyse de l'activité promotrice du LTR.....	34
2.1.1 Cellules.....	34
2.1.2 Souche virale, propagation du virus et extraction de l'ARN cellulaire.....	34
2.1.3 Obtention des LTR (extraction de l'ADN génomique, clonage et analyse des séquences).....	36
2.1.4 Restauration des mutations au niveau de LTRm par mutagenèse dirigée.....	39
2.1.5 Le test de transactivation <i>in vitro</i>	41
2.1.5.1 Transfection cellulaire.....	41

2.1.5.2 Dosage des protéines totales et détermination de l'activité β -galactosidase.....	42
2.1.5.3 Le test ELISA-CAT.....	43
2.2. Étude de la variabilité génétique du gène accessoire <i>rev</i>	44
2.2.1 La réaction de transcription inverse.....	45
2.2.2 Les réactions de PCR.....	45
2.2.3 Le clonage, séquençage et analyse des séquences des produits de PCR.....	46
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	49
3.1 Diversité génétique et analyse de l'activité promotrice du LTR.....	49
3.1.1 Génération par PCR et vérification sur gel des fragments d'ADN correspondant à la région LTR du génome du VIB.....	49
3.1.2 Analyse des séquences des LTR.....	49
3.1.3 Activité promotrice des LTR du VIB.....	50
3.1.4 Impact des mutations aux positions 191, 250 et 271 sur l'activité promotrice augmentée du LTRm.....	51

3.2 Étude de la variabilité génétique du gène accessoire <i>rev</i>	53
3.2.1 Génération par RT-PCR et vérification sur gel des fragments d'ADN correspondant au gène <i>rev</i> du VIB.....	53
3.2.2 Analyse des séquences du gène <i>rev</i> du VIB.....	53
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	65
4.1 La diversité génétique: une particularité chez les virus à ARN.....	65
4.2 La diversité génétique dans la région LTR du VIB.....	66
4.3 La diversité génétique dans le gène <i>rev</i> du VIB.....	74
CONCLUSION.....	77
APPENDICES.....	79
BIBLIOGRAPHIE.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure schématisée du virion du VIB.....	26
Figure 1.2	Organisation génomique du provirus du VIB.....	27
Figure 1.3	Le cycle de réplication du VIB.....	28
Figure 1.4	Représentation schématique des domaines structuraux des protéines Tat (A) et Rev (B) du VIB.....	29
Figure 1.5	Mécanismes d'importation et d'exportation associés à la protéine Rev du VIB.....	31
Figure 3.1	Produits de PCR préparés à partir d'extraits d'ADN cellulaire total (cellules Cf2Th) et séparés sur gel d'agarose 1% démontrant l'obtention de fragments spécifiques des LTR du VIB.....	56
Figure 3.2	Alignement des séquences en acides nucléiques des LTR sauvage (LTRs; pré-infection) et mutant (LTRm; post-infection) du VIB.....	57
Figure 3.3	Analyse <i>in vitro</i> de l'activité promotrice des LTR sauvage (LTRs) et mutant (LTRm) en utilisant un test de transactivation CAT (choramphénicol-acétyl-transférase).....	59
Figure 3.4	Analyse <i>in vitro</i> de l'activité promotrice des LTR du VIB restaurés (à partir de LTRm) au génotype sauvage (LTRs) en utilisant un test de trans-activation CAT (choramphénicol acétyl-transférase)...	61
Figure 3.5	Produits de RT-PCR préparés à partir d'extraits d'ARN cellulaire total (cellules Cf2Th) et séparés sur gel d'agarose 1% démontrant l'obtention de fragments spécifiques du gène <i>rev</i> du VIB.....	63

Figure 3.6 Alignement des séquences en acides aminés de la protéine
Rev du VIB.....64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Manifestations cliniques principales des infections lentivirales.....	32
Tableau 1.2	Les motifs de liaison et les facteurs cellulaires correspondants..... au niveau du LTR du VIB	33
Tableau 2.1	Amorces nucléotidiques utilisées pour l'obtention des séquences LTR et pour la restauration des mutations du LTRm du VIB.....	47
Tableau 2.2	Amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène <i>rev</i> du VIB.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP	Protéine activatrice
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARN pol II a	ARN polymérase 2 hypophosphorylée
ARN pol II 0*	ARN polymérase 2 hyperphosphorylée
ARNt	ARN de transfert
AP-1	Activator protein 1
AP-3/ RCE	Activator protein-3/ retinoblastoma control element
AP-4	Activator protein 4
CA	Protéine de la capsid
CAEV	Virus de l'arthrite encéphalite caprine
CAT	Chloramphénicol acétyl transférase
CBP	Protéine liant CREB (<i>Creb Binding Protein</i>)
CDK7	Kinase 7 dépendante des cyclines
CDK9	Kinase 9 dépendante des cyclines
CF2th	Lignée cellulaire <i>Fœtal Canine Thymus</i>
CRM1	Chromosome region maintenance protein 1
CTD	Domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase 2
EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine
Env	Protéine de l'enveloppe virale
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G	Guanine
Gag	Groupe antigène
Gly	Glycine
GTP	Guanosyl triphosphate
GRE	Glucocorticoid-responsive Element
IL	Interleukine
Ile	Isoleucine
JDV	Virus Jembrana bovin (<i>Jembrana disease virus</i>)
Kda	Kilodalton
LTR	Longues répétitions terminales (<i>long terminal repeat</i>)
MA	Protéine de la matrice
NC	Protéine de la nucléocapsid
NF-κB	Facteur nucléaire κB (<i>nuclear factor κ B</i>)
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
pb	Paire de base

PBS	<i>Primer binding site</i>
PBSS	Solution phosphate saline tamponée
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PPT	<i>Poly-purine tract</i>
PTEFb	Facteur positif de l'élongation de la transcription b
R	Séquences redondantes
Rev	Régulateur de l'expression virale
RRE	Élément répondant à Rev (<i>Rev responsive element</i>)
RT	Rétrotranscription
RCE	Retinoblastoma control element
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SP-1	Protéine stimulatrice
SU	Protéine de surface
TAR	Élément répondant à Tat (<i>transactivaton response element</i>)
Tat	Transactivateur de la transcription
TM	Protéine transmembranaire
Tmx	Transmembranaire x
U	Uracile
U3	Région unique en 3'
U5	Région unique en 5'
VIB	Virus de l'immunodéficience bovine
VIF	Virus de l'immunodéficience féline
Vif	Facteur infectieux viral
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VMV	Virus Maedi-Visna
Vpy	Protéine virale y
Vpw	Protéine virale w

RÉSUMÉ

Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) est un rétrovirus qui partage des propriétés similaires avec les autres lentivirus, dont le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'expression des gènes lentiviraux dépend des protéines régulatrices virales Tat et Rev qui interviennent, dans le cycle de réplication virale, aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, respectivement. Les longues répétitions terminales (LTR) du génome viral fournissent, quant à elles, les signaux d'initiation, d'amplification et de terminaison de la transcription. La protéine Tat, pour exercer son activité transactivatrice, interagit avec une séquence d'ARN appelée TAR ("transactivation response element") présente sur tous les transcrits viraux. Tat recrute le facteur positif de l'élongation de la transcription b (pTEFb) au niveau du promoteur viral des LTR pour augmenter l'efficacité de transcription de l'ARN polymérase II. La protéine nucléaire Rev est impliquée dans le transport nucléocytoplasmique des ARN viraux mono- et non épissés. Récemment, une protéine hybride Tat/Rev constituée de 236 acides aminés (Tat 236) a été découverte à partir de virions isolés de la rate de lapins qui avaient été infectés trois ans auparavant, suggérant une évolution temporelle du virus *in vivo*. L'objectif de ce travail était de déterminer si des variations génétiques et/ou fonctionnelles pouvaient se retrouver dans d'autres parties du génome du variant du VIB impliquées dans la régulation de l'expression génique virale, notamment au niveau du LTR et du gène accessoire *rev* du VIB. Ainsi, en utilisant la technique d'amplification en chaîne des gènes (PCR), une séquence LTR mutante (LTRm) fut mise en évidence, démontrant la présence de trois mutations aux positions 191, 250 et 271 lorsque comparée à celle du LTR pré-infection obtenue du génome des virus ayant servi à l'infection des lapins. La séquence du LTR pré-infection était 100% identique à celle du LTR sauvage (LTRs) retrouvée dans la littérature. En utilisant un test de transactivation CAT *in vitro* avec la protéine Tat103 comme agent transactivateur, le LTRm démontra une activité promotrice d'au moins deux fois supérieure à celle obtenue avec les LTRs. Pour tenter d'associer ces mutations au nouveau caractère phénotypique de LTRm, des mutants de restauration furent développés par PCR-mutagenèse pour revenir au phénotype LTRs. L'ensemble des résultats obtenus suggère que les mutations en positions 250 et 271 seraient impliquées dans l'activité promotrice augmentée de LTRm. Finalement, l'analyse de séquences du gène *rev* pré- et post-infection a montré deux mutations aux positions 48 (Val → Ile) et 76 (Pro → Leu), la dernière étant localisée dans un domaine riche en arginine. Fait intéressant, la mutation à la position 76 avait aussi été rapportée auparavant dans la portion Rev de Tat236. Les résultats obtenus suggèrent une évolution temporelle du VIB dans le cours d'infections *in vivo* au niveau du LTR et du gène *rev*, similaire à celle antérieurement décrite pour le gène *tat*.

Mots clés : lentivirus, région du LTR, gène *rev*, diversité génétique

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) est un rétrovirus du genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* qui possède des propriétés communes avec les autres lentivirus, incluant le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Gonda, 1994). Plusieurs lentivirus sont connus pour leur capacité à se répliquer dans les leucocytes avec comme résultante potentielle des dysfonctionnements du système immunitaire (St-Louis *et al.* 2004).

Le génome du VIB est une molécule d'ARN de 8,96 kb (Garvey *et al.* 1990). Comme tous les rétrovirus, le VIB induit une infection persistante en s'intégrant sous forme d'ADN proviral dans le génome cellulaire. L'ADN proviral du VIB (8,96 kb) contient des gènes structuraux (*gag*, *pol* et *env*) et plusieurs gènes auxiliaires dont les gènes *tat* (transactivateur de la transcription) et *rev* (régulateur de l'expression virale) qui sont importants pour l'expression optimale du virus, ainsi que les gènes *vif* (facteur infectieux viral), *tmx* (transmembranaire x) et les gènes codant pour les protéines virales w (*vpw*) et y (*vpy*) (Gonda, 1992; St-Louis *et al.* 2004). Chaque extrémité du génome proviral présente les longues répétitions terminales (LTR) qui sont constituées des régions U3, R, U5 contenant des signaux d'initiation, d'amplification et de terminaison de la transcription (Gonda, 1992; St-Louis *et al.* 2004).

La diversité génétique et antigénique des protéines de l'enveloppe virale représente des mécanismes connus que les lentivirus utilisent pour déjouer la réponse

immunitaire. Au niveau de la glycoprotéine de surface gp 100 du VIB, il y a présence de régions conservées et des régions hypervariables similaires à la protéine gp 120 du VIH (Suarez et Whetstone, 1997). La présence d'une population virale appelée "quasi-espèces" a été démontrée chez les vaches infectées expérimentalement avec le VIB, mais, en général, peu d'informations sont disponibles sur la variabilité génétique des séquences régulatrices de l'expression virale. Cependant, cette interprétation reste incertaine, puisque des taux faibles de réplication virale en présence des anticorps ont été observés en absence de variation antigénique chez le bétail infecté (Carpenter *et al.* 2000).

Il existe une variabilité génétique dans les protéines accessoires du VIH avec un impact sur l'expression des autres gènes viraux ou la pathogénicité résultante. Par exemple, la protéine Tat du VIH serait impliquée dans la diminution de la réponse immunitaire et pourrait s'avérer une cible intéressante pour le développement de traitements antiviraux (Goldstein, 1996). Par ailleurs, Tat a été retrouvée chez tous les lentivirus.

L'analyse de la variabilité génétique et de la pathogénicité est souvent compliquée par le manque de modèles animaux adéquats. Il fut démontré qu'une infection chronique et persistante peut se développer chez des lapins infectés par le VIB, suggérant ainsi leur utilisation en tant que modèle pour l'étude de ce lentivirus (Pifat *et al.* 1992; Van der Maaten et Whetstone, 1992). Au niveau de la région *env* chez des lapins inoculés expérimentalement avec le VIB R29, il y a un

polymorphisme génétique viral (Kalvatchev *et al.* 2000). Finalement, une diversité génétique et fonctionnelle (traduite par l'apparition d'une nouvelle protéine Tat236 dotée d'une activité transactivatrice augmentée par rapport à celle de la Tat103 standard du VIB) fut observée pour le gène *tat* du VIB dans le cours d'une infection chronique *in vivo* chez le lapin (St-Louis *et al.* 2005).

Puisqu'une diversité génétique et fonctionnelle fut observée dans le gène *tat* chez les lapins infectés avec le VIB, il est possible que semblable variabilité puisse aussi survenir dans d'autres séquences du VIB impliquées dans la régulation de l'expression virale, comme la région du LTR et le gène accessoire *rev*. Ainsi, les objectifs du travail sont de: 1) déterminer la diversité génétique au niveau de la séquence LTR et du gène accessoire *rev* chez le VIB au cours d'une infection chronique *in vivo*; 2) caractériser l'activité promotrice du LTR potentiellement mutant dans un test de transactivation CAT *in vitro*; et 3) s'il y a lieu, analyser l'impact des mutations sur l'activité promotrice du LTR.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les lentivirus

Le genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* est constitué de plusieurs virus ayant une structure génétique et des mécanismes moléculaires de réplication communs (Blacklaws *et al.* 1995). Les lentivirus, qui ne sont pas oncogènes et qui, contrairement aux autres rétrovirus, peuvent infecter des cellules qui ne sont pas en division, causent une infection persistante et progressive. Ils induisent des changements pathologiques lents, chroniques et dégénératifs chez les hôtes infectés, souvent associés au développement de dysfonctionnements immunologiques (Kaur *et al.* 2001). Tous les lentivirus infectent des cellules de la lignée monocyte/macrophage. De plus, le virus de l'immunodéficience féline (VIF), le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) et le VIH infectent aussi les cellules T et, par conséquent, engendrent des signes cliniques d'immunodéficience notables chez les hôtes infectés (Gonda *et al.* 1987; Agnarsdóttir *et al.* 2000). Le lentivirus le plus étudié est le VIH, l'agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme.

L'enzyme transcriptase inverse est une molécule virale caractéristique des membres de la famille des *Retroviridae*. En effet, pendant le cycle de réplication des lentivirus, tout comme celui de tous les rétrovirus, la transcriptase inverse voit à

synthétiser, à partir de l'ARN génomique, un brin d'ADN pour la formation d'un hybride ARN-ADN. Le brin d'ARN est ensuite éliminé grâce à l'activité RNase H de la transcriptase inverse. Le brin d'ADN est ensuite dupliqué en ADN bicaténaire dans le cytoplasme en utilisant les enzymes polymérases de la cellule hôte. L'ADN bicaténaire migre dans le noyau où il s'intègre dans l'ADN cellulaire grâce à l'action de l'endonucléase virale, appelée aussi intégrase (St-Louis *et al.* 2004).

1.2 Historique du VIB

En 1969, le Dr. Carl Seger, aux États-Unis, a observé la détérioration progressive d'une vache laitière gestante appelée R29. Les signes cliniques observés étaient caractérisés par une lymphoadénopathie, des lésions du système nerveux central, une faiblesse progressive et un amaigrissement (Malmquist *et al.* 1969). Lorsque le virus isolé de cette vache a été inoculé chez de jeunes veaux, ces animaux ont développé une leucocytose et une lymphoadénopathie qui ont persisté pendant plusieurs mois (Van Der Maaten *et al.* 1992). Les études histopathologiques ont indiqué une hyperplasie folliculaire dans les nœuds lymphatiques (Van Der Maaten *et al.* 1992). Ce n'est que quelque 20 ans plus tard que Gonda et collaborateurs (1987) démontrèrent que le VIB est un lentivirus avec des similarités morphologiques, génétiques et antigéniques avec le VIH.

1.3 Généralités sur le virus de l'immunodéficience bovine (VIB)

1.3.1 Distribution et aspects pathologiques

La distribution du VIB est probablement mondiale. Diverses études séro-épidémiologiques démontrent que l'infection virale est disséminée dans toute l'Amérique du Nord, l'Asie, l'Australie, la Nouvelle Zélande ainsi qu'en Europe (Cockerell *et al.* 1992; St Cyr Coasts *et al.* 1994; Muluneh, 1994; Hirai *et al.* 1996; Polack *et al.* 1996; Cavirani *et al.* 1998; Meas *et al.* 1998, 2000; Burkala *et al.* 1999; Scobie *et al.* 2001).

Le VIB est lié aux lentivirus associés aux inflammations chroniques (ce qui inclut également le virus de l'arthrite-encéphalite caprine ou CAEV et le virus de l'anémie infectieuse des équidés ou EIAV) plutôt qu'à ceux liés à des maladies d'immunodéficience grave (le VIH, le VIF et le VIS). Les maladies qui ont été associées aux divers lentivirus, incluant le VIB, sont répertoriées dans le Tableau 1.1. Puisque le VIB se réplique dans les monocytes/macrophages, il pourrait ainsi être associé à un dysfonctionnement possible du système immunitaire (Carpenter *et al.* 1992; Onuma *et al.* 1992). Cela pourrait expliquer le fait que plusieurs conditions secondaires comprenant la mammite, les pododermatites et d'autres maladies bactériennes sont associées à l'infection par le VIB, suggérant ainsi un impact sur la productivité des troupeaux de vaches laitières et l'état général de santé des animaux (McNab *et al.* 1994; Jacobs *et al.* 1995). En outre, l'association entre l'infection par le VIB et le développement du syndrome paraplégique chez les bovins a été suggéré (Walder *et al.* 1995).

1.3.2 Tropisme cellulaire *in vitro* et infectivité du VIB chez les hôtes hétérologues

Le VIB induit un effet cytopathique caractérisé par la formation de *syncytia* au niveau des cellules permissives infectées. L'expression de gènes viraux varie considérablement selon le type cellulaire, suggérant que des facteurs cellulaires sont exigés pour la mise en place de l'infection virale (Fong *et al.* 1997; Kempster *et al.* 2002).

Des modèles animaux ont été développés pour la recherche sur le VIB. Par exemple, les chèvres et les moutons expérimentalement infectés avec le VIB développent une réponse immunitaire humorale spécifique sans le développement de signes cliniques (Whetstone *et al.* 1991; Jacobs *et al.* 1994). Différentes études ont aussi démontré que l'infection persistante pouvait être établie chez les lapins blancs de la Nouvelle Zélande inoculés avec le VIB R29 avec une réaction immunitaire humorale rapide et durable (Pifat *et al.* 1992; Van Der Maaten et Whetstone, 1992; Abed *et al.* 1999; Abed et Archambault, 2000). Il n'y a eu aucun symptôme clinique chez les animaux infectés pendant toutes ces études. En revanche, d'autres études (Kalvatchev *et al.* 1998, 2000) ont montré le développement de signes cliniques (anorexie, perte de poids, diarrhée, hypoalgésie, torticollis, dysfonctionnements récurrents des cellules T et B, lymphadénopathie et splénomégalie) chez plusieurs lapins infectés avec le VIB R29, tandis que d'autres, aussi infectés par le virus, sont demeurés asymptomatiques.

1.3.3 Morphologie du VIB

Le VIB est un virus enveloppé d'un diamètre de 120-130 nm, constitué d'un génome viral à ARN (deux molécules identiques) associé à une transcriptase inverse et à des nucléoprotéines intimement reliées à la capsid de forme conique. Cette nucléocapside, qui protège le génome viral, est entourée d'une enveloppe virale constituée d'une double couche de phospholipides issus de la membrane plasmique de la cellule infectée. Cette enveloppe contient les glycoprotéines virales de surface (SU ou gp100) et transmembranaire (TM ou gp45), associées de manière non covalente (St-Louis *et al.* 2004) (Figure 1.1).

1.3.4 Organisation génomique et régulation de l'expression génique du VIB

L'ARN génomique du VIB, comme celui des autres lentivirus, est monocaténaire et de polarité positive (+). Lors de la réplication, chaque molécule d'ARN servira de matrice pour la synthèse de l'ADN proviral grâce à la transcriptase inverse. Le génome proviral du VIB, d'une longueur de 8,96 paires de bases (pb), contient, dans l'ordre 5' à 3', les trois gènes structuraux communs à tous les rétrovirus: le gène *gag* codant en outre pour la nucléoprotéine et la protéine majeure p26 de la capsid; le gène *pol* qui code pour les enzymes virales protéase, transcriptase inverse et intégrase; et le gène *env* qui code pour les protéines de l'enveloppe gp45 et gp100 (Garvey *et al.* 1990) (Figure 1. 2). Le génome proviral du VIB contient aussi plusieurs gènes auxiliaires, aussi appelés accessoires, localisés entre ou chevauchant les gènes *pol* et *env*: ce sont les gènes *tat* (transactivateur de la transcription) et *rev* (régulateur de l'expression virale), *vif* (facteur infectieux viral) et

tmx (transmembranaire x) et ceux codant pour les protéines virales w (*vpw*) et y (*vpy*) (Gonda, 1992). Bien que les protéines Tat, Rev et Tmx aient été détectées dans les cellules infectées par le VIB, seules les protéines Tat et Rev régulent l'expression virale du VIB (Gonda, 1994). Il est notable que la transcription des ARNm de Tat et Tmx est détectée par transcription inverse-PCR (RT-PCR) chez le bétail infecté (Baron *et al.* 1995).

Le génome proviral est flanqué, à ses extrémités 5' et 3', de régions terminales non codantes appelées LTR (longues répétitions terminales ou "long terminal repeat"). Ces régions LTR sont nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée et sont directement impliquées dans l'expression des gènes viraux. Le LTR du VIB est constitué de 589 nucléotides et contient des éléments et signaux nécessaires à l'expression génique du virus. Le LTR peut être décomposé en trois régions appelées U3 (positions -1 à -384 par rapport au site d'initiation de la transcription), R (positions +1 à +112) et U5 (positions +113 à +206) (Fong *et al.* 1995, 1997). Les éléments en *cis* de la région U3 nécessaires pour l'activité fonctionnelle du LTR du VIB incluent la boîte TATA qui agit comme promoteur du LTR, une séquence enhancer et des sites de liaison pour des facteurs cellulaires régulant la transcription tels NF- κ B, GRE, AP-4, AP-1, CAAT, ATF/CRE et Sp1 (trois motifs répétés) (Figure 1.2 et Tableau 1.2) (Gonda, 1994; Fong *et al.* 1995; St-Louis *et al.* 2004). La région R, en plus de définir les sites d'initiation (site CAP) et de terminaison (site poly A) de la transcription, contient, près de son extrémité 5', une séquence pouvant être transcrite en une molécule d'ARN en forme

d'épingle appelée TAR (ou "Tat responsive element") sur laquelle se fixera la molécule Tat du VIB pour assurer la transcription complète des transcrits viraux.

1.3.5 Le cycle de réplication du VIB

Le cycle de réplication est semblable à celui des autres rétrovirus et est réalisé en plusieurs étapes allant de l'attachement du virus à la cellule cible jusqu'à la libération de nouvelles particules virales à l'extérieur de la cellule (Figure 1.3).

a) L'attachement et l'entrée

L'infection virale est lancée quand la protéine de surface SU se lie (attachement) au récepteur des cellules de l'hôte. Cette interaction favorise un changement de conformation de la protéine virale transmembranaire TM (gp45), qui entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule infectée, facilitant ainsi l'entrée du virus dans la cellule (Sommerfelt, 1999). Bien que le récepteur cellulaire pour le VIB reste inconnu, il a été suggéré que le virus pourrait se lier à CCR5, une molécule de la famille des β -chémokines (Wright *et al.* 2002). La molécule CCR5 agit de fait comme un co-récepteur pour les souches de VIH qui ont un tropisme pour les monocytes/macrophages (Wright *et al.* 2002).

b) La rétrotranscription

Cette étape est essentielle à la réplication de tous les rétrovirus. À l'intérieur de la nucléocapside, la rétrotranscription est initiée au site de liaison d'amorce (PBS pour *primer binding site*) présent à l'extrémité 5' des ARN génomiques. Ce site est

lié à une courte séquence d'ARNt qui a été acquise lors du cycle viral précédent, servant d'amorce pour débiter la synthèse d'un premier brin d'ADN de polarité négative grâce à la transcription inverse virale. L'ARN génomique est ensuite dégradé de l'hybride ARN:ADN formé par la fonction ribonucléase H de la transcriptase inverse. Toutefois, une courte séquence d'ARN génomique (PPT pour *poly-purine tract*) est conservée pour permettre la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Pendant la rétrotranscription, la séquence U5 est la première région transcrite, formant le 3' terminal du LTR, alors que la séquence U3 devient le 5' terminal du LTR. Ainsi, tel que mentionné auparavant, chaque région LTR située à chaque extrémité du génome proviral est constituée, dans l'ordre 5' à 3', des régions U3, R et U5. L'ADN double-brin migre ensuite vers le noyau où il s'intègre au hasard dans le génome cellulaire de l'hôte grâce à l'intégrase virale (Mak et Kleiman, 1997).

c) L'intégration

L'intégration, comme la rétrotranscription, est une étape complexe et essentielle pour l'expression des gènes viraux. L'extrémité des LTR est clivée au niveau de séquences inversées et répétées (IR), ce qui entraîne la perte de deux paires de bases au niveau de chaque extrémité de l'ADN proviral. L'ADN cellulaire est ensuite clivé par l'intégrase virale puis lié à l'ADN viral. Une fois intégré, les gènes viraux peuvent demeurer silencieux pendant plusieurs années ou devenir actifs en

présence de stimuli cellulaires variés (Clements et Zink, 1996; Hindmarsh et Leis, 1999).

d) L'expression des gènes viraux

La transcription de l'ADN proviral débute en présence de divers facteurs cellulaires qui s'assemblent autour de la région U3 du LTR. L'ARN polymérase cellulaire commence la transcription des ARNm viraux à partir du site +1 situé dans la région R. Les ARNm précoces, suite à un mécanisme d'épissage multiple, quittent le noyau pour être traduits dans le cytoplasme. Ces ARNm ont une taille de 1,4 et 1,7 kb, codant respectivement pour les protéines accessoires Tat et Rev. Dans la phase tardive de l'expression des gènes viraux, des ARNm mono- ou non épissés de 3,8 kb, 4,1 kb et 8,5 kb et dont la localisation dans le cytoplasme dépend de la protéine Rev sont générés, codant pour les protéines structurales ou formant les ARN génomiques de pleine longueur.

e) L'assemblage, le relargage et la maturation des particules virales

Les différentes protéines virales et l'ARN génomique migrent vers la membrane plasmique pour l'assemblage. Le virus alors encapsidé acquiert son enveloppe par bourgeonnement à la membrane cytoplasmique, ce qui conduit à la formation de particules virales. La particule virale, encore immature, est relarguée via des processus encore mal connus pour le VIB. Cependant une étude récente suggère que l'ubiquitination de Gag serait importante pour l'exocytose des particules virales (Strack *et al.* 2002). La maturation des virions survient suite au clivage du précurseur

protéique Gag par la protéase virale, libérant les protéines de la capsidie et de la nucléocapsidie, ce qui résulte ainsi en la formation de la capsidie conique du VIB. Les particules virales nouvellement formées peuvent alors infecter d'autres cellules environnantes (Garoff *et al.* 1998).

1.4 La protéine régulatrice de l'expression Tat du VIB et des autres lentivirus

Tout comme celle des autres lentivirus, la protéine Tat (transactivateur de la transcription) du VIB est une protéine nucléaire d'un poids moléculaire de 14 kDa qui dérive d'un ARNm ayant subi un épissage multiple (Gonda, 1992; Southgate et Green, 1995). Cet ARNm (1,7 kb) est composé d'un exon non codant contenant la séquence *leader* et de deux exons additionnels codants (Gonda, 1992). Il existe deux formes connues de la protéine Tat chez le VIB qui toutes deux sont dotées d'activité transactivatrice comparable (Liu *et al.* 1992). La première forme est constituée de 103 acides aminés (Tat103) et provient essentiellement de la séquence du premier exon codant, localisée entre les nucléotides 5112 et 5541 sur le génome. Toutefois, la séquence codante ne débute pas au début de l'exon mais plutôt 116 nucléotides localisés en aval du site accepteur de l'épissage. Le troisième exon est non codant à cause de la présence d'un codon d'arrêt situé avant le site donneur d'épissage de l'exon 2 (Liu *et al.* 1992; Fong *et al.* 1997). La deuxième forme de la protéine Tat est constituée de 108 acides aminés (Tat108). Elle origine du premier exon codant pour les 98 premiers acides aminés (donc identiques aux 98 premiers acides aminés de Tat103) et de l'exon deux qui code pour les dix acides aminés additionnels. Pour la Tat108, le site d'épissage est localisé à la position 5521 du génome. Par comparaison,

pour le virus Maedi-Visna (VMV), le CAEV et le VIF, la protéine Tat est codée par un seul exon. Dans le cas du VIH, de l'EIAV et du VIS, Tat est codée par deux exons. De plus chez le VIH, tout comme le VIB, deux formes de la protéine Tat ont été identifiées: Tat86 et Tat101 (Jeang *et al.* 1999).

Les lentivirus peuvent être classés en deux groupes en fonction du mode d'action de la protéine Tat. Le premier groupe comprend le VIH, le VIS, VIB et l'EIAV pour lesquels Tat se lie avec une molécule d'ARN appelé TAR. Le second groupe formé par le VMV, le CAEV et le VIF ne possède pas de séquence TAR. Bien que la transactivation d'EIAV soit contrôlée par le facteur pTEFb, la protéine Tat de ce virus, au contraire des autres lentivirus, ne contient pas un domaine structural riche en cystéines (Albrecht *et al.* 2000). La boucle apicale dans le TAR du VIB, composée des résidus CAUU, n'est pas essentielle pour l'attachement de Tat en comparaison avec le VIH (Chen et Frankel, 1995; Barboric *et al.* 2000). Fong et son équipe (1997) ont aussi démontré que la protéine Tat du VIB peut activer le LTR du VIH, mais à un faible niveau comparé à celui de la protéine Tat du VIH.

L'initiation de la transcription s'effectue au niveau du LTR par le recrutement des facteurs de transcription habituels des cellules eucaryotes. La protéine Tat contribuerait à l'acétylation des histones afin de briser les nucléosomes et permettre une meilleure accessibilité du promoteur viral aux facteurs de transcription (Rana *et al.* 1999; Deng *et al.* 2000). L'ARN polymérase II cellulaire réagit avec le promoteur viral du LTR via le facteur de transcription de type II D (TFIID) avec une première

phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II par la cycline dépendante des kinases 7 (CDK7), une sous-unité de TFIIH (Karn, 1999). L'efficacité de la transcription dépend ensuite de la présence de la protéine Tat qui diffère des activateurs transcriptionnels habituels par le fait qu'elle ne se lie pas à l'ADN, mais plutôt sur un site particulier d'une séquence d'ARN appelée TAR (Southgate et Green, 1995). Cette séquence d'ARN est non traduite et est localisée en 5' dans la région LTR de tous les transcrits viraux naissants qui se replient pour former cette structure d'ARN en épingle composée d'une tige, d'un renflement et d'une boucle apicale (St-Louis *et al.* 2004). La protéine Tat du VIB augmente les niveaux d'ARNm suite à son interaction, via son domaine riche en arginine, au niveau du renflement de TAR. L'activité de Tat requiert le recrutement de complexes cyclin T1/cyclin-dépendent kinase 9 (CDK9) (P-TEFb) via son domaine riche en glycines à TAR. Puis, CDK9 favorise l'élongation de la transcription en phosphorylant davantage le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II (Ping et Rana, 1999; Barboric *et al.* 2000; Bogerd *et al.* 2000). Ainsi, la protéine Tat du VIB serait impliquée non seulement dans l'initiation de la transcription mais aussi au niveau de l'élongation (Liu *et al.* 1999). Il a également été démontré que la protéine Tat du VIH doit être acétylée au niveau de certaines lysines du domaine basique par des enzymes cellulaires pour son activité fonctionnelle (Kiernan *et al.* 1999; Ott *et al.* 1999; Rana et Jeang, 1999; Garber *et al.* 2000). Cette acétylation aurait pour effet de faciliter la liaison de Tat avec pTEFb. Cependant, l'acétylation des protéines Tat des autres lentivirus, incluant le VIB, n'a pas encore été démontrée.

La protéine Tat du VIB est une phosphoprotéine dont la structure est analogue à celle des lentivirus retrouvés chez les primates (Carpenter *et al.* 1993; Taube *et al.* 1999). Elle est divisée en cinq régions ou domaines: un domaine N-terminal (acides aminés 1 à 37), un domaine riche en cystéines (acides aminés 38 à 53), un domaine central hydrophobe (acides aminés 54 à 67), une région basique comprenant en outre 7 arginines (acides aminés 68 à 81) et un domaine C-terminal (acides aminés 82 à 103 ou 108) (Figure 1.4A) (Liu *et al.* 1992; Fong *et al.* 1997). Ces domaines sont localisés aux mêmes endroits sur les protéines Tat103 et Tat108 puisqu'elles ne diffèrent que par leurs derniers acides aminés du domaine C-terminal.

Les cinq régions ou domaines de Tat forment deux domaines fonctionnels distincts soit le domaine dit d'activation qui interagit directement avec des facteurs cellulaires et le domaine de liaison à l'ARN. Le domaine d'activation comprend la portion N-terminale, la séquence riche en cystéines et la zone centrale hydrophobe et est responsable de l'interaction avec le facteur cellulaire cycline T1 (Bieniasz *et al.* 1998; Bogerd *et al.* 2000). Le domaine de liaison à la molécule d'ARN TAR comprend quant à lui la séquence basique riche en arginine (GPRPRGTRGKGRRIRR) qui constitue également le signal de localisation nucléaire (NLS) de la protéine (Bieniasz *et al.* 1998). La protéine Tat comporte donc, au niveau de son domaine de liaison, des résidus qui interagissent directement avec l'ARN (Arg70, Gly71, Thr72, Arg73, Arg77 et Ile79) alors que d'autres ont plutôt un rôle conformationnel (Gly74 et Gly76). En fait, les glycines en position 71, 74 et 76 sont

nécessaires pour augmenter l'affinité de liaison avec l'ARN (Chen et Frankel, 1995; Puglisi *et al.* 1995).

1.5 La protéine Rev chez les lentivirus

La protéine Rev du VIB (23 kDa) est une phosphoprotéine nucléaire et nucléolaire de 186 acides aminés qui est codée par un ARNm multi-épissé de 1,4 kb qui contient un exon non-codant (exon 1) et deux exons codants (exons 2 et 3). Le premier exon codant (positions 5415 à 5541 du génome viral) est dans le même cadre de lecture que le gène *env* alors que le second (positions 7637 à 8068) est dans un cadre différent (Oberste *et al.* 1991, 1993). Un niveau critique d'expression de Rev est nécessaire au passage de la phase précoce de réplication à la phase tardive de l'expression des gènes viraux (Olsen *et al.* 1992; Arrigo et Chen, 1991). Alors que la protéine Tat régule l'expression génique virale au niveau transcriptionnel, Rev agit plutôt au niveau post-transcriptionnel (Mikaelian *et al.* 1996; Brice *et al.* 1999). La protéine Rev possède un signal d'exportation nucléaire et facilite l'exportation des ARNm viraux non épissés ou simplement épissés du noyau vers le cytoplasme en se fixant sur les transcrits viraux tardifs dans une région appelée RRE (élément répondant au Rev) originant de la région du gène *env* du génome (Cheng *et al.* 1990, 1993; Tiley *et al.* 1990). Le RRE est formé d'une molécule d'ARN sous forme d'épingle avec une longueur variable parmi les lentivirus (par exemple, 312 pb pour le VIB et 204 pb pour le CAEV) (Schoborg et Clements, 1996; Molina *et al.* 2002).

La protéine Rev du VIB est structurellement analogue à la protéine Rev de VIH (Carpenter *et al.* 1997). La protéine Rev possède une région amino-terminale ainsi qu'un domaine riche en arginine pour la liaison à RRE et la localisation nucléaire (signal d'importation) de la protéine (Figure 1.4 B). En plus, elle contient des domaines de multimérisation qui sont prédits comme étant situés de chaque côté du domaine riche en arginine et qui vont permettre à plusieurs unités Rev d'agir sur un même brin d'ARN. Il y a aussi un domaine d'exportation nucléaire riche en leucine suivie d'un domaine carboxy-terminal (Zapp *et al.* 1991; Jeong *et al.* 2000).

Dans le cas du VIH-1, il fut démontré que le domaine riche en arginine est composé de 16 acides aminés (RQARRNRRRRWRERQR; résidus 35 à 50) localisés dans la région amino-terminale de Rev, alors que le domaine riche en leucine qui contient le signal d'exportation nucléaire (LPPLERLTLTD; résidus 75 à 84) est situé dans la région carboxy-terminale de la protéine (Demart *et al.* 2003). Les domaines de Rev, quant à leur position exacte, ne sont pas bien caractérisés chez le VIB. Par contre, en comparant les séquences entre Rev du VIB et Rev du VIH, le domaine riche en arginine de Rev du VIB serait localisé dans une région composée des résidus 92 à 110 (EQNRRKQERRLSGLDRRIQ) alors que le domaine d'exportation nucléaire riche en leucine serait associé aux résidus 143 à 155 (PLGHLPPRSYFKL) (Oberste *et al.* 1993). Les domaines de multimérisation de Rev chez les lentivirus sont, par contre, peu caractérisés. De fait, les alignements de séquences entre Rev du VIB et du VIH n'ont pu identifier leur localisation (Zapp *et al.* 1991).

L'activité fonctionnelle de Rev dépend des éléments de localisation (NLS) et d'exportation (NES) nucléaire (Figure 1.5). En effet, les signaux d'import nucléaire (appelés aussi signaux de localisation nucléaire) sont de courtes séquences nucléotidiques qui sont nécessaires pour la localisation nucléaire des protéines qui les portent. Par contre, les signaux d'exportation nucléaire (NES), généralement riches en leucine, ont le rôle inverse des NLS. Une protéine possédant un NES est capable de former un complexe avec une exportine spécifique afin de promouvoir son exportation vers le cytoplasme. Ainsi, ces signaux contenus dans les domaines de Rev permettent le transport continu de Rev entre le noyau et la cytoplasme (Zapp *et al.* 1991; Jeong *et al.* 2000). Après traduction, l'élément de Rev se lie via le NLS avec des molécules d'importine- β (protéine de 97 kDa principalement localisée dans le cytoplasme), ce qui lui permet de traverser les pores nucléaires (Gorlich *et al.* 1995). Ensuite, le domaine riche en arginine de Rev contenant le NES se lie dans le noyau au RRE inclus dans les ARNm viraux incomplètement ou non épissés (Tiley *et al.* 1991). Plusieurs protéines de Rev lient le même RRE par la capacité de multimérisation qui est nécessaire pour l'exportation nucléaire efficace des transcrits viraux (Tiley *et al.* 1992; Cullen, 1998).

1.6 Les autres protéines accessoires chez le VIB

Le gène *tmx* code pour la protéine Tmx (19 kDa) qui a été détectée dans le cytoplasme des cellules infectées avec le VIB et dans les virions produits (Gonda, 1994). Par contre, le rôle de cette protéine reste inconnu. Le gène *tmx* est situé à l'extrémité 3' du génome dans les séquences codantes de la protéine TM (Tmx:

transmembranaire x en référence à sa localisation sur le génome et non pas à sa fonction). La position du gène suggère que Tmx puisse avoir des fonctions semblables au produit du gène *nef* des lentivirus de primates qui serait impliquées dans le développement et le maintien d'une infection active *in vivo* (Gonda, 1994). De plus, chez le VIH de type 1 (VIH-1), la protéine Nef est responsable de la réduction de l'expression du marqueur CD4 à la surface des cellules immunitaires l'exprimant (Aldrovandi *et al.* 1998). Nef produit aussi une activation de la caspase-3 et une baisse de l'endocytose de CD4 et l'inhibition de la prolifération cellulaire à l'interleukine-2 (IL-2) dans les mécanismes cette fois de suppression de l'apoptose (Gougeon *et al.* 2001).

Alors que les gènes *tat*, *rev* et *tmx* codent pour des protéines précoces, *vif*, *vpw* et *vpy* codent pour des protéines exprimées plus tardivement dans le cycle de réplication virale (Gonda, 1994). Elles sont traduites à partir d'ARNm mono-épissés d'environ 4,1 kb. Le rôle de Vif chez le VIB n'est pas clairement établi mais cette protéine porte des similitudes avec les protéines Vif des autres lentivirus, ce qui suggère qu'elle pourrait occuper des fonctions similaires. L'absence du gène *vif* chez le VIH-1 provoque l'apparition de particules virales moins infectieuses (Borman *et al.* 1995). De fait, Vif augmente l'infectiosité et la propagation du virus, notamment dans les lymphocytes et les macrophages (Kao *et al.* 2003). De plus, Vif jouerait un rôle crucial dans la morphogenèse du nucléoïde (core) viral (Simon *et al.* 1997).

Les protéines Vpw (7 kDa) et Vpy (10 kDa) du VIB seraient respectivement analogues aux protéines Vpu (ou Vpx du VIH-2 et VIS) et Vpr qui sont présentes chez les lentivirus de primates (Gonda, 1994). La protéine Vpu aurait un rôle dans l'augmentation de l'assemblage des particules virales au niveau de la membrane plasmique (Hofmann *et al.* 1998). Elle serait aussi responsable de la dégradation de la molécule CD4 au niveau du réticulum endoplasmique créant ainsi une diminution de l'expression de cette molécule à la surface des cellules. Ceci empêcherait la surinfection des cellules avoisinantes en plus d'inhiber certaines fonctions immunitaires (Sommerfelt, 1999). La protéine Vpr serait plutôt impliquée dans la localisation nucléaire du complexe de pré-intégration dans les cellules qui ne sont pas en division et pourrait ainsi réguler le cycle cellulaire (Heinzinger *et al.* 1994; Kashanshi *et al.* 2000). Il est intéressant de mentionner que des différences significatives de l'activité de Vpr peuvent être trouvées dans différentes souches du VIH et représente une cible intéressante pour un traitement de thérapie génique (Chen *et al.* 1996). Quoiqu'il en soit, aucune étude n'a démontré de fonctions notables pour les protéines Vpw et Vpy du VIB.

1.7 Diversité génétique chez les rétrovirus

Les rétrovirus peuvent varier génétiquement, résultant au concept de «quasi-espèce», un terme qui désigne la présence de plusieurs variants dans une population virale donnée. Cette variation génétique peut être le résultat d'erreurs de la transcriptase inverse, de la recombinaison génétique, de mutations ou encore de forces sélectives qui agissent sur la population virale (Boyer *et al.* 1992; Truyen *et al.*

1995; Mansky, 1998). La variation génomique permet aux rétrovirus de contourner les défenses immunitaires de l'hôte, de changer leur tropisme cellulaire, d'acquérir une résistance contre les drogues antivirales et/ou de contrecarrer les efforts de développer des vaccins efficaces (Fouchier *et al.* 1992; Milich *et al.* 1993; Najera *et al.* 1995). La variabilité génétique est, la plupart du temps, confinée aux régions du génome codant pour les protéines de surface (SU) de l'enveloppe à cause de la pression exercée par le système immunitaire de l'hôte (Chirmule et Pahwa, 1996). Cependant, la variabilité génétique peut être observée dans d'autres régions du génome incluant des séquences non codantes ou encore celles codant pour des protéines régulatrices/accessoires qui sont impliquées dans la régulation de l'expression génique du virus ou dans la biogenèse virale.

Chez le VIH en particulier, des variations au niveau des gènes *pol* et *env* ont été associées à l'acquisition d'une résistance à certaines drogues lentivirales et à la capacité du virus d'échapper aux défenses immunitaires (Rubio *et al.* 1997; Pieniazek *et al.* 2000; Vergne *et al.* 2000; Hsiou *et al.* 2001). Des variations génétiques ont été également rapportées chez le VIB au niveau des gènes *pol* et *env* (Suarez et Whetstone, 1995, 1997; Cooper *et al.* 1999; Meas *et al.* 2001). L'analyse des séquences nucléotidiques de deux clones moléculaires du VIB (clones BIV 106 et BIV 127) a notamment montré une diversité globale de 1,7%, avec 75% de toutes les mutations étant observées dans la région du gène *env* codant pour la protéine de surface SU du virus (Garvey *et al.* 1990). De plus, des variations génétiques ont été observées parmi plusieurs isolats américains du VIB tant au niveau du gène *pol*

(divergence de quelque 10% au niveau du gène *pol*) que du gène *env* (Suarez *et al.* 1993, 1995). Une étude détaillée a notamment démontré que la variation observée au niveau du gène *env*, avec en plus une variation dans la taille du gène codant pour la deuxième région hypervariable de la protéine de surface (SU), serait probablement le résultat de recombinaison génétique chez les bovins naturellement ou expérimentalement infectés avec ces isolats (Suarez et Whetstone, 1995, 1997). Même si la signification biologique de ces variations n'est pas connue, les résultats globaux de ces comparaisons génomiques suggèrent que le VIB est aussi assujéti au concept de "quasi-espèce" (Domingo *et al.* 2006).

Tel que mentionné plus haut, la variation génétique peut aussi se produire au niveau des gènes régulateurs/accessoires ou dans des séquences impliquées dans l'expression génique des lentivirus. De telles variations ont notamment été rapportées chez le VIH au niveau du LTR et des gènes *tat* et *rev* chez des individus infectés par le virus. Il fut démontré que les mutations observées au niveau de ces séquences ont eu un impact significatif dans la régulation de l'expression génique virale et il fut suggéré que cette variation pouvait avoir un impact sur la virulence et la pathogénicité du virus (Golub *et al.* 1990; Martins *et al.* 1991; Nagashunmugam *et al.* 1992; Krebs *et al.* 1998; Zhang et Dayton, 1998; Peloponese *et al.* 1999). De plus, il fut démontré qu'une variation au niveau de la protéine Rev du VIH affecte l'exportation nucléaire des ARNs viraux, et conséquemment, les niveaux de production des protéines virales structurales. Finalement chez l'EIAV, une corrélation

entre la variabilité dans le gène *rev* et la progression de la maladie a été observée (Belshan *et al.* 2001).

Benko et collaborateurs (1990) ont rapporté chez le VIH-1 l'existence d'une protéine hybride entre Tat, Env et Rev qu'ils ont appelée Tev (28 kDa). Cette nouvelle protéine est composée d'une partie d'un exon de *tat*, une portion de *env* et le second exon de *rev*. Tev est composée de 201 acides aminés constitués des résidus 1 à 57 de Tat, 129 à 166 de gp120 et 27 à 116 de Rev. Elle conserve les activités principales de ces deux protéines mais son activité transactivatrice est inférieure à la protéine originale (Benko *et al.* 1990). Une protéine hybride Tat-Rev, similaire à Tev, a également été rapportée par Salfeld *et al.* (1990). Cet hybride, nommé Tnv, démontre également une activité transactivatrice inférieure aux protéines Tat originales et aucune activité associée à Rev n'a été observée avec cette nouvelle protéine. La découverte de Tev et Tnv de même que les analyses de leurs activités démontrent clairement que des variations au niveau de Tat peuvent altérer le potentiel transactivateur de la protéine.

Chez le VIB, St-Louis et collaborateurs (2005) ont pu mettre en évidence un nouveau type de protéine Tat, appelée Tat236, au niveau des cellules infectées avec un variant du VIB. Ce variant fut isolé de la rate de lapins, quelque 3 ans et demi suivant l'infection avec la souche R29 du VIB. Tat236 est une protéine hybride qui est composée des premiers 98 acides aminés communs aux protéines standard Tat103 et Tat108, et des derniers 136 acides aminés de la protéine Rev. Bien que peu de

mutations furent observées au niveau des séquences primaires des régions Tat et Rev de Tat236, la découverte de cette protéine, en plus de la Tat103 standard, pourrait suggérer une évolution temporelle du VIB, ce qui est en accord avec le principe de «quasi-espèce» décrit précédemment.

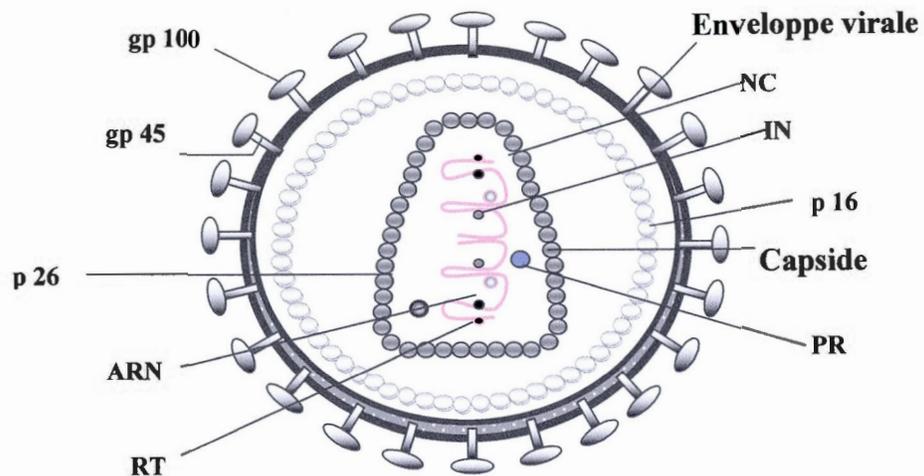


Figure 1.1 Structure schématisée du virion du VIH. Le virus contient une capsid formée de la protéine p26 à l'intérieur de laquelle se retrouvent deux molécules d'ARN liées de manière non-covalente, la nucléoprotéine formant la nucléocapside (NC), l'intégrase (IN), la protéase (PR) et la transcriptase inverse (RT). La capsid est elle-même entourée d'une matrice formée de la protéine p16 et d'une enveloppe bi-lipidique externe à laquelle sont ancrées les glycoprotéines transmembranaires gp 45 auxquelles sont liées les glycoprotéines de surface gp100 (Adapté de St-Louis *et al.* 2004).

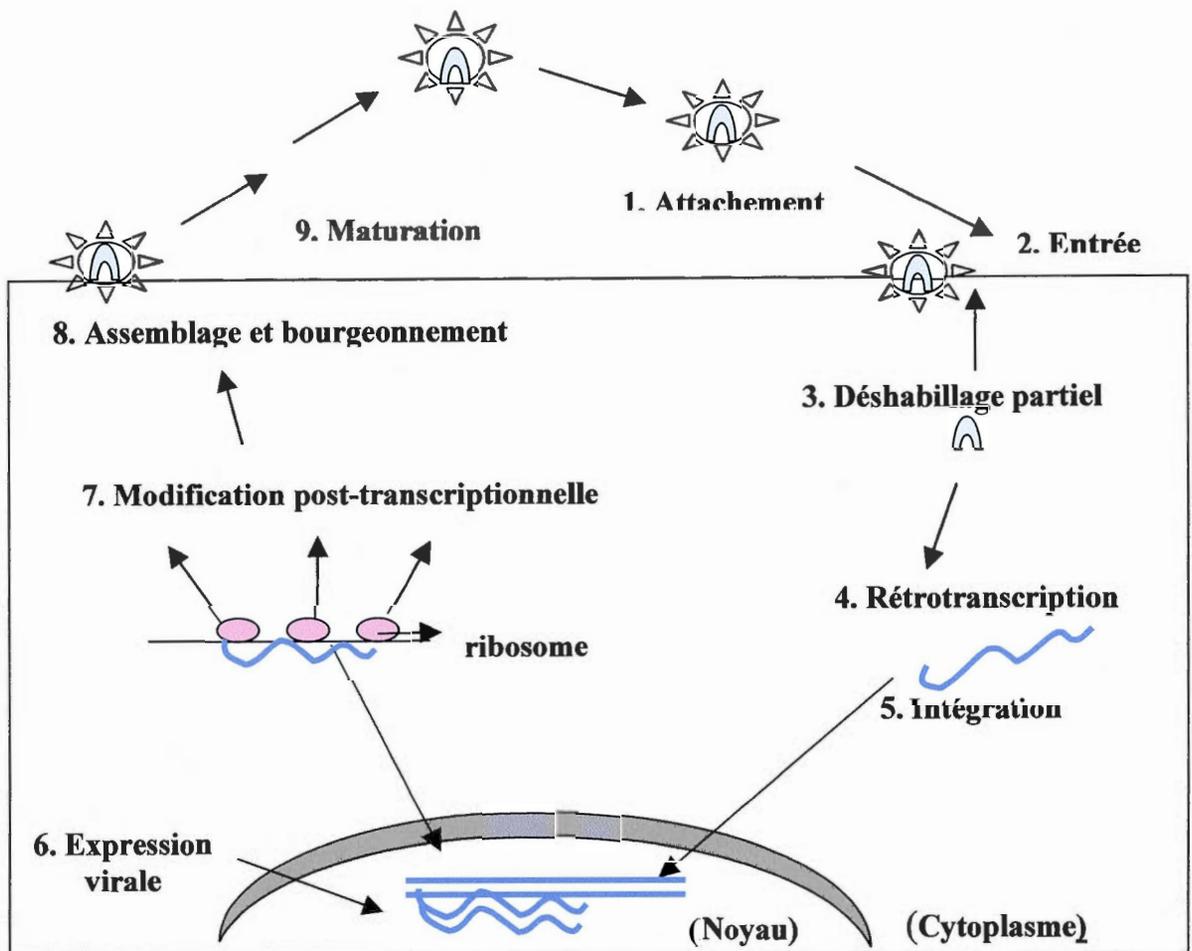
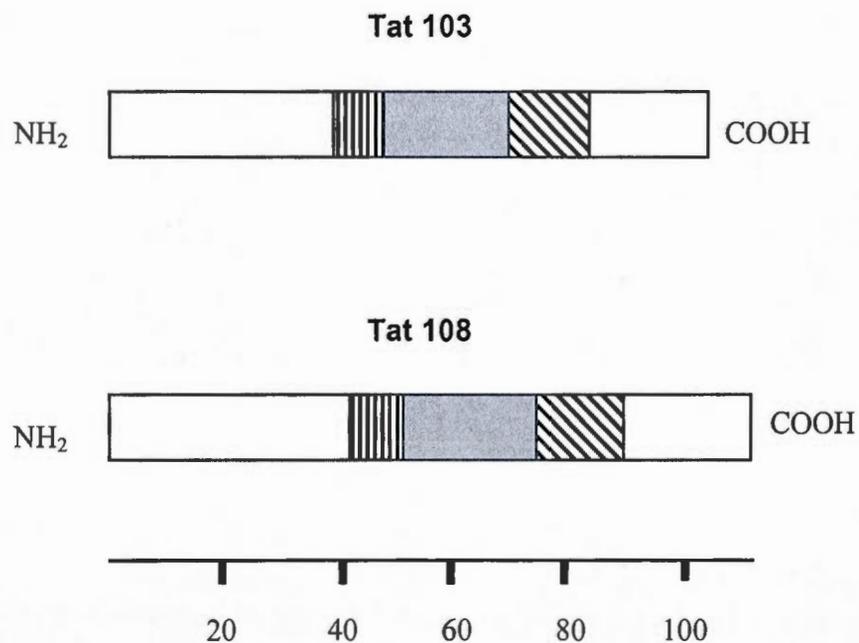
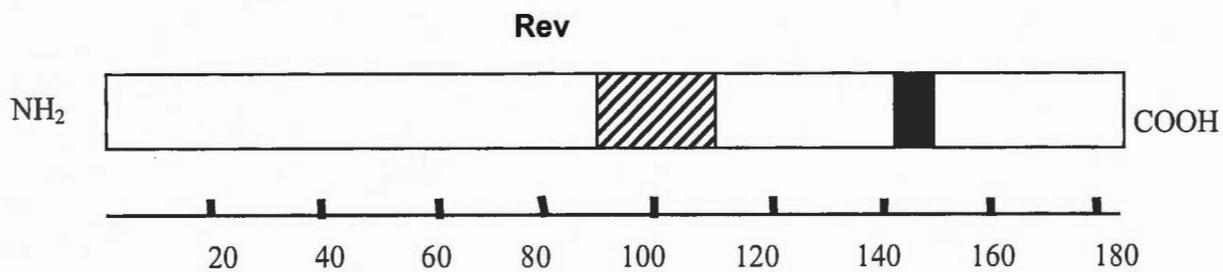


Figure 1.3 Le cycle de réplication du VIB. La réplication du VIB inclut plusieurs étapes: l'attachement et l'entrée, la décapsidation partielle, la rétrotranscription, l'intégration, l'expression des gènes viraux, l'assemblage, le bourgeonnement (relargage) et la maturation des particules virales qui a lieu à l'extérieur de la cellule.

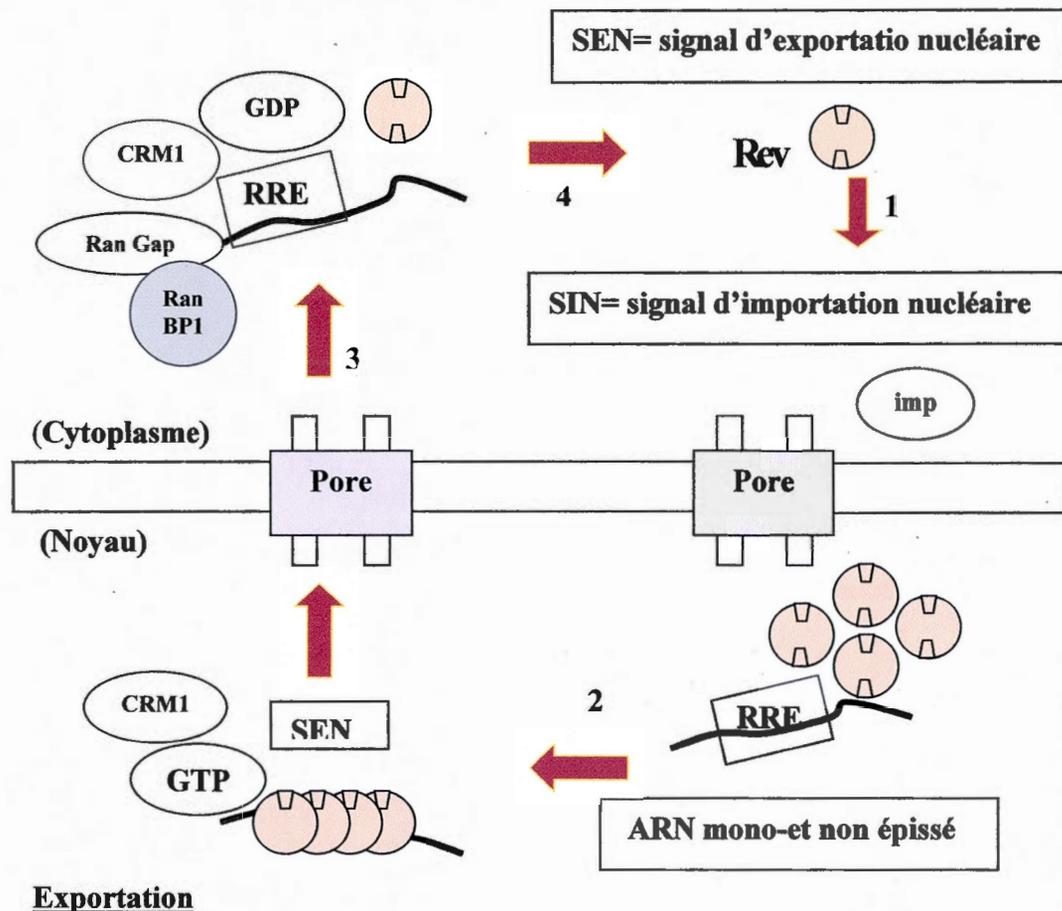
Figure 1.4 Représentation schématique des domaines structuraux des protéines Tat (A) et Rev (B) du VIB. Les protéines Tat103 et Tat108 sont composées des domaines suivants: acide amino-terminal (résidus 1-37), riche en cystéine (résidus 38-53), corps central (résidus 54-67), riche en arginine (résidus 68-81) et carboxy-terminal (résidus 82 à 103 ou 108). Les domaines majeurs de Rev (186 acides aminés) consistent en des domaines riches en arginine (résidus 92-110) et en leucine (résidus 143-155), ce dernier contenant le signal d'exportation nucléaire. Les domaines riches en arginine des protéines Tat et Rev contiennent les signaux d'importation (localisation) nucléaire, et sont impliqués dans la liaison à la structure TAR ("Transactivation responsive element") et le RRE ("Rev responsive element"), respectivement.

A



B

-  Domaine riche en arginine: site de liaison de la cycline T1
-  Domain du core
-  Domaine riche en arginine : site de liaison du TAR+ NLS (signal de localisation)
-  Domaine riche en arginine : site de liaison du RRE+ NLS
-  Domaine riche en leucine: SEN (signal d'exportation nucléaire)



Exportation

Figure 1.5 Mécanismes d'importation et d'exportation associés à la protéine Rev du VIB. Ces mécanismes sont schématisés en quatre grandes étapes. 1) Suivant sa traduction, la protéine se lie à l'importine- β (imp) via son SIN ce qui résulte au passage de Rev du cytoplasme au noyau; 2) Rev se dissocie alors de l'importine- β par l'action de la molécule Ran-GTP; Rev ainsi libérée se lie au motif RRE de chacun des transcrits mono-et non épissés via son domaine basique pour former un complexe multimérique par lequel le SEN devient accessible pour l'interaction avec des exportines (la protéine de maintenance de région chromosomique 1, CRM1) liées au guanosyl triphosphate (GTP); 3) le complexe traverse alors le pore nucléaire à l'aide des nucléoporines Rip/Rab et entre dans le cytoplasme; 4) les facteurs cellulaires RanGTPase et RanBP1 hydrolysent le GTP, ce qui provoque la dissociation du complexe et la traduction des transcrits viraux en protéines; la protéine Rev ainsi libérée peut alors recommencer un nouveau cycle d'importation/exportation.

Hôte	Virus	Manifestations cliniques
Petits ruminants	Virus du Maedi-Visna (VMV) et virus de l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV)	Encéphalomyélite, amaigrissement, arthrite, mammite
Bovins	Virus de l'immunodéficience bovine (VIB)	Lymphadénopathie, lymphocytose, fièvre, amaigrissement, anorexie, anémie, lymphadénopathie
Équins	Virus de l'anémie infectieuse des équidés (EIAV)	Pneumonie interstitielle diffuse, fièvre, encéphalopathie, amaigrissement, anémie
Singe	Virus de l'immunodéficience simienne (VIS)	Déficit immunitaire, infections opportunistes, lymphadénopathie, syndrome neurologique, arthrite, pneumonie interstitielle diffuse
Homme	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	Déficit immunitaire, infections opportunistes, lymphadénopathie, syndrome neurologique, pneumonie interstitielle diffuse
Félins	Virus de l'immunodéficience féline (VIF)	Déficit immunitaire, infections opportunistes, lymphadénopathie, syndrome neurologique, amaigrissement

Tableau 1.1 Manifestations cliniques principales des infections lentivirales (adapté de Narayan et Clements, 1989).

Facteur de transcription	Motif de liaison Séquences 5'→3'	Positions dans U3 (identifiées par Fong <i>et al.</i> 1995) ¹	Positions dans U3 (validées et/ou prédites) ²
NF-κB (nuclear factor κB)	CCGGA CTCCC	-347 à -337	38-50
AP-1 (activator protein 1)	TGATTCA	-142 à -136	242-249
AP-4 (activator protein 4)	TCAGCTGA	-185 à -178	198-207
AP-3/ RCE (activator protein-3/ retinoblastoma control element)	TGTGGTTAG	-176 à -168	210-220
SP (stimulator protein family)	CTCCGCCCT	-77 à -70	307-407
	AAACGCCTA	-59 à -68	408-418
	ACACGCCCA	-46 à -38	338-348
RCE (retinoblastoma control element)	AGTGGTTAA	-133 à -125	252-260
GRE (glucocorticoid Responsive element)	GGTTCT	-254 à -249	129-136
CAAT ATF/ CRE (activating transcription facto response element)	GCAATGATGTAG	-106 à -102	281-292
Ets (transcription elements)	AGACAGGAAATG	Non identifiée	179-190 (prédite)

Tableau 1.2 Les motifs de liaison et les facteurs cellulaires correspondants au niveau du LTR du VIB. ¹ Les motifs auxquels se lient les facteurs cellulaires qui interviennent dans la transcription du LTR du VIB ont été identifiés par Fong *et al.* (1995) par rapport à la position +1 qui délimite la région R du LTR où débute la transcription. ² La validation des positions des facteurs de transcription identifiés par Fong *et al.* (1995) a été réalisée sans égard à la position +1 du début de la transcription avec le logiciel TF ("Transcription Factor") Search, version 1.3 en corrélation avec le logiciel TFMATRIX profile database (Heinemeyer *et al.* 1998). Ces positions sont par conséquent toutes à dénomination positive, la base localisée à l'extrémité 5' du LTR étant la base 1.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Diversité génétique et analyse de l'activité promotrice du LTR

2.1.1 Cellules

Les cellules Cf2Th (lignée continue de cellules de thymus canin) ont été maintenues dans des flacons de culture cellulaire de 75 cm² (Sarstedt, Newton, NC) à l'aide du milieu DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's medium*) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 8% de sérum de veau foetal inactivé (SVF) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA) et des antibiotiques usuels (pénicilline/streptomycine). Les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules Cf2Th exprimant de manière constitutive la Tat103 du VIB (lignée stable) ont été propagées dans le même milieu de culture décrit ci-haut contenant, comme antibiotique, de la généticine (400 µg/ml) (Clontech, Palo Alto, CA).

2.1.2 Souche virale, propagation du virus et extraction de l'ARN cellulaire

Dans le laboratoire du Dr. Archambault, un modèle d'infection chronique *in vivo* a été développé chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande (*Oryctolagus cuniculus*) suite à l'injection intrapéritonéale de cellules Cf2Th infectées par l'isolat R29 du VIB (Bouillant *et al.* 1989; St-Louis *et al.* 2005). Un VIB mutant fut isolé à partir de la rate de lapins quelque trois ans et demi suivant l'infection (St-Louis *et al.*

2005). Ce virus avait d'abord été isolé sur cellules primaires FBLU ("Fetal bovine lung cells") puis adapté sur cellules Cf2Th.

Le VIB fut propagé essentiellement selon la méthode décrite par St-Louis *et al.* (2005). Ainsi les cellules Cf2Th infectées encore adhérentes dans des cultures cellulaires démontrant un effet cytopathique important (détachement des *syncytia* cellulaires à environ 50% de la surface cellulaire) ont été rincées avec un tampon phosphate salin (PBSS) pH 7,3, traitées avec une solution de trypsine 1% dans du PBS pour les décoller, puis mélangées à un ratio 1: 3 avec des cellules Cf2Th normales non infectées. Les cellules ainsi propagées arrivaient à confluence généralement entre 48 et 72 heures suivant le passage afin de réinitier un nouveau cycle d'infection virale.

L'extraction de l'ARN cellulaire total (à partir des cellules infectées avec le virus et à partir des cellules témoins non-infectées) contenant en outre les ARNm spécifiques de la séquence Rev a été effectuée avec le Trizol-LS (Gibco/Invitrogen) pour produire la lyse cellulaire. L'étape dite de séparation a été réalisée avec 200 µl de chloroforme et la précipitation des ARN contenus dans la phase supérieure du mélange fut réalisée avec 1 ml de 2-propanol à la température de la pièce. Après un lavage du culot avec de l'éthanol 70%, l'ARN a été séché à l'air puis dissout dans de l'eau traitée avec 0,1% (v/v) de diéthylpyrocarbonate (DEPC) afin de préserver l'intégrité de ces ARN.

2.1.3 Obtention des LTR (extraction de l'ADN génomique, clonage et analyse des séquences)

L'extraction de l'ADN génomique cellulaire (cellules Cf2Th) contenant l'ADN proviral du VIB a été réalisée en utilisant le réactif DNazol (Gibco/Invitrogen). Suite aux étapes de séparation et de précipitation tel que décrit ci-haut, le culot a été lavé avec de l'éthanol 70%. Après séchage du culot à l'air, l'ADN a été dissout dans une solution NaOH (8 mM).

L'ADN (un μg) génomique cellulaire contenant l'ADN intégré (provirus) du VIB, incluant les LTR, a été amplifié par PCR (40 cycles) en utilisant, dans la réaction, les amorces LTR VIB 5' sens et LTR VIB 3' anti-sens (10 pmol/ μl) (Tableau 2.1), 1 μl de l'enzyme *Vent* DNA polymérase (5 unités/ μl) (New England Biolabs, Ipswich, MA), un μl de dNTP (désoxynucléotides triphosphates; 10 mM de chaque composant) (GE HeathCare, Little Chalfont, UK) et de l'eau pour un volume total de 50 μl . Chaque cycle comprenait: une dénaturation de 1 min à 94°C, une hybridation de 2 min à 53, 5°C et une extension de 1 min à 72°C (*Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400*). Les fragments amplifiés furent ensuite visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% [en utilisant un tampon de gel contenant 40 mM de Tris acétate et 1 mM EDTA, avec pH 8,0 et une solution de bromure d'éthidium à raison de 0,5 $\mu\text{g/ml}$] soumis à un champ électrique de 100 volts pendant 50 minutes. Les fragments d'ADN obtenus par amplification ont été ensuite

visualisés sous rayons ultraviolets (UV), puis purifiés du gel avec des colonnes Ultra-Free DA selon les recommandations du fabricant (Millipore, Bedford, MA).

Le clonage des produits de PCR [LTR pré- (LTR sauvage ou LTRs) et LTR post-infection (LTR mutant ou LTRm)] a été réalisé dans le vecteur pBlueScript (SK+) (Stratagene, La Jolla, CA) préalablement digéré avec l'enzyme EcoRV (Sambrook *et al.* 1999). L'insertion des fragments d'ADN amplifiés a été effectuée par ligation (à la température de 4°C et pour toute la nuit) de 5 µl de chacun des ADN amplifiés, 10 mM d'adénosine 5'-triphosphate (ATP), 2 µl (2 µg) du vecteur, 5,5 U d'ADN ligase T4 (GE HeathCare) et du tampon OPA 1X (*One-Phor-All*, GE HeathCare) dans un volume total de 10 µl.

Les produits de ligation obtenus ont ensuite servi à transformer des bactéries compétentes d'*Escherichia coli* DH5α (Ultramax) en utilisant un milieu Luria Bertani (LB) selon un protocole standard (Sambrook *et al.* 1989). Les colonies obtenues furent par la suite propagées en milieu liquide LB pour la production des ADN plasmidiques par la technique de lyse alcaline (Sambrook *et al.* 1989). Pour ce faire, 3 ml de milieu de culture LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline ont été inoculés avec chacune des colonies obtenues à l'étape précédente, puis incubés une nuit à 37°C avec une agitation constante de 250 rpm (Environ Shaker, Lab-Line instruments, Melrose Park, IL). Par la suite, après une étape de centrifugation, le culot de bactéries a été resuspendu dans 100 µl de solution I (glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM) pour la lyse cellulaire pendant 5 minutes avant d'ajouter 200 µl de

solution II (0,2 N NaOH et 1% sodium dodecylsulfate SDS). Puis, 150 µl de solution III (60 % 5M d'acétate de potassium, 11,5 % d'acide acétique glacial) pour neutraliser la réaction ont été ajoutés et la solution a été déposée sur la glace pendant trois minutes avant d'être centrifugée à 11 000 x g pendant 10 minutes. Par la suite, le surnageant a été précipité à l'isopropanol, puis centrifugé 25 minutes à 11 000 x g. Le culot obtenu a été lavé à l'éthanol 70%, centrifugé 2 minutes à 11 000 x g, séché puis resuspendu dans 20 µl de TE. Les plasmides obtenus furent ensuite analysés par séquençage (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal, Canada) afin de confirmer la nature des fragments d'ADN spécifiques aux inserts d'intérêt.

Les inserts correspondant aux LTRs et LTRm furent ensuite sous-clonés dans dans le vecteur pBLCAT3 [(5071 pb) (Fong *et al.* 1995)]. Pour ce faire, les plasmides obtenus ci haut furent digérés avec les enzymes de restriction *PpuM I* (GGGTGGGACCT) et *Blp I* (GCTGAGC) qui coupent dans les extrémités 5' (après la 15^{ième} base de la séquence LTR) et 3' (après la base 548 de la séquence LTR) de la région LTR, respectivement. Les inserts correspondant aux séquences LTR furent ensuite purifiés sur gel d'agarose en utilisant une colonne Ultra-Free DA. L'insertion des fragments d'ADN obtenus fut réalisée comme précédemment suite à une ligation (à la température de 4°C et pour toute la nuit) de 5 µl de l'un ou l'autre des inserts d'ADN, 10 mM d'adénosine 5'-triphosphate (ATP), 2 µl (2 µg) du vecteur pBLCAT3 préalablement digéré avec les enzymes de restriction, 5,5 U d'ADN ligase T4 (GE

HeathCare) et du tampon OPA 1X (*One-Phor-All*, GE HeathCare) dans un volume total de 10 μ l.

Les fragments spécifiques aux inserts d'intérêt ADN contenus dans les ADN plasmidiques ainsi obtenus (plasmides pBLTR pre-CAT et pBLTR post-CAT) furent ensuite séquencés. L'analyse des nucléotides (alignement de séquences) du LTRs (pré-infection) versus le LTRm (post-infection) à partir des plasmides obtenus (un minimum de trois clones plasmidiques pour chacun des LTR séquencés) a été réalisée avec le logiciel BioEdit (Hall, 1999).

2.1.4 Restauration des mutations au niveau de LTRm par mutagenèse dirigée

La réparation des mutations du LTRm (post-infection) pour revenir au phénotype sauvage (pré-infection) a été réalisée à partir du plasmide pBLTRpost-CAT par mutagenèse dirigée en mettant à profit une série de réactions de PCR et des amorces appropriées (Tableau 2.1). Des constructions ciblant les mutations seules (191, 250 ou 271), en combinaison de deux (191/250, 191/271 ou 250/271) ou en combinaison de trois (191/250/271) furent générées par des étapes successives de divers PCR. Chaque paire d'amorces sens et anti-sens dans laquelle chacune des mutations était restaurée fut sélectionnée de sorte que les produits 1 et 2 obtenus lors des deux premières réactions de PCR pouvaient s'apparier suite à un chevauchement de séquences en leurs extrémités 5' et 3', respectivement, une conséquence mise à profit dans la troisième réaction de PCR. Ainsi, le plasmide pBLTRpost-CAT restauré par exemple à la position 191 fut obtenu en se servant dans le premier PCR

des amorces LTR BIV 5' et 191-R (produit 1) et dans le deuxième PCR des amorces LTR BIV3' et 191-F (produit 2). Les produits de PCR ainsi obtenus furent ensuite purifiés sur gel avant d'être soumis ensemble dans un même tube à une troisième réaction de PCR avec les amorces LTR BIV 5' et LTR BIV 3'. Ainsi, les fragments de PCR 1 et 2, suite à leur appariement via leur partie commune apportée par les amorces 191-F et 191-R utilisées dans les deux premières réactions de PCR ont pu s'apparier, puis être amplifiés pour obtenir un LTR de pleine longueur avec la mutation restaurée. Les mutations 250 et 271 furent restaurées individuellement en adoptant la même stratégie et leurs amorces respectives (Tableau 2.1). De la même façon, les restaurations doubles 191-250 et 191-271 furent générées à partir de la construction LTR préalablement restaurée à la position 191 en se servant des amorces spécifiques de la deuxième mutation à réparer. La restauration double 250-271 fut générée à partir de la construction LTR préalablement restaurée à la position 250 en utilisant les amorces spécifiques de la mutation 271 à réparer. Finalement, la restauration triple 191-250-271 fut obtenue à partir de la construction préalablement restaurée aux positions 191 et 250 en utilisant les amorces spécifiques de la mutation 271 à réparer. Dans tous les cas, les produits de PCR obtenus dans lesquelles les mutations étaient restaurées ont été ensuite reclés dans le vecteur pBLCAT3 tel que décrit ci haut (section 2.1.3). Les inserts finalement ont été séquencés pour s'assurer des réparations des mutations observées. Dans tous les cas, les plasmides obtenus (LTRs pré-infection, LTRm post-infection et les LTR restaurés) ont été utilisés dans les tests de transactivation *in vitro*.

2.1.5 Le test de transactivation *in vitro*

2.1.5.1 Transfection cellulaire

Il a déjà été démontré que les cellules Cf2Th étaient efficaces pour la propagation du VIB (Gonda, 1992). La protéine Tat du VIB peut activer le LTR dans divers types de cellules, mais avec des niveaux variables selon la lignée cellulaire utilisée (Barboric *et al.* 2000).

La technique de transfection utilisée consistait à introduire dans les cellules le plasmide codant pour la protéine Tat103 du VIB ainsi qu'un second plasmide contenant le gène rapporteur CAT (choramphénicol acetyl-transférase) placé sous le contrôle du LTR du VIB. Le polyfect (Qiagen, Mississauga, Ontario) entoure l'ADN et permet son entrée dans la cellule grâce à la fusion du liposome avec la membrane cellulaire. Le principe du test est que plus l'activité promotrice du LTR est forte, plus la production de CAT sera élevée. Dans certains cas, une lignée dite stable exprimant constitutivement la protéine Tat103 peut aussi être utilisée. Dans l'un ou l'autre des cas, un autre plasmide codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV- β -gal) (Promega, Madison, Wisconsin) a été utilisé pour s'assurer de l'efficacité de la technique de transfection et pour normaliser les données obtenues pour le dosage de CAT.

Préalablement aux transfections cellulaires, les ADN plasmidiques des bactéries *Escherichia coli* DH5 α ont été extraits et purifiés (*Maxipreps plasmid purification protocol*, Qiagen), analysés sur gel d'agarose 1% et quantifiés par

spectrophotométrie (DO à 260 nm) (Sambrook *et al.* 1989). Dans le cadre des expériences qui ont été réalisées, les cellules à transfecter (Cf2Th exprimant ou non constitutivement la Tat103 du VIB) ont étéensemencées (1.5×10^3 cellules par ml) dans un plaque de 6 puits (diamètre de 1 cm par puits) en utilisant le milieu DMEM enrichi de 8 % de SVF et des antibiotiques. Lorsqu'elles eurent atteint une confluence entre 50 et 80% (tel qu'estimé en microscopie optique), elles ont été lavées avec du PBSS, pH 7,3, puis transfectées avec 1 μ g de chaque plasmide [(pBLCAT3 contenant un LTR à être analysé, pRSV- β -gal codant pour la β -galactosidase, et, dans certains, le plasmide pCMV-Tat103)] (Fong *et al.* 1998). Les cellules ont été lavées 48 heures post-transfection avec du PBSS pH 7,3, puis lysées (tampon de lyse alcaline 1X, Qiagen). Les protéines obtenues ont été conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.1.5.2 Dosage des protéines totales et détermination de l'activité β -galactosidase

Le dosage des protéines totales des échantillons a été effectué en microplaque par la méthode de Lowry (Bio-Rad DC *protein assay*, Mississauga, Ontario) avec la présence d'un détergent (Triton X-100 1%). Dans un plateau de 96 puits, 4 μ l de lysat cellulaire de chaque échantillon ont été déposés, puis 100 μ l de la solution A (un mélange de 1,5 ml de solution de tartrate de cuivre alcalin et 30 μ l de réactif alcalin) ont été ajoutés, ainsi que 200 μ l de réactif B (réactif de Folin). Suivant une incubation de 10 minutes à la température de la pièce, la densité optique a été déterminée par lecture spectrophotométrique à 655 nm (lecteur de microplaque, modèle 550, Bio-Rad).

Une courbe standard fut réalisée à l'aide d'une concentration d'albumine sérique bovine [(*bovine serum albumine* ou BSA) (concentration initiale de 100 µg/ml)] connue, selon des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16, afin d'établir la concentration en protéines des extraits cytoplasmiques provenant des cellules.

L'activité de l'enzyme β -galactosidase a été déterminée selon le protocole décrit dans Sambrook *et al.* (1989) et a servi d'indicateur de l'efficacité de la transfection et à normaliser les valeurs obtenus dans l'ELISA CAT (voir ci bas). Pour ce faire, 50 µg de protéines cellulaires totales (dans un volume de 50 µl) ont été incubés avec 50 µl de tampon d'essai (100 mM de tampon de phosphate de sodium, pH 7,3, 2 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoéthanol et 133 mg/ml de *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) pendant 30 min à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'addition de 150 µl de Tris-HCl, 1 M, pH 10. La réaction colorimétrique a été mesurée à une longueur d'onde de 410 nm (lecteur de microplaque, modèle 550, Bio-Rad).

2.1.5.3 Le test ELISA-CAT

L'activité promotrice du LTR mutant versus celle obtenue avec le LTR sauvage a été déterminée par le test ELISA-CAT (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Roche). En résumé, 200 µl des lysats cellulaires post-transfection ont été ajoutés aux puits préalablement traités avec un anticorps monoclonal anti-CAT. Après deux heures d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés avec la solution fournie par la compagnie avant d'ajouter 200 µl solution d'anticorps anti-CAT-DIG (anticorps anti-CAT marqués à la digoxigénine). Durant une seconde période

d'incubation (1 h) à 37°C où les anticorps se sont fixés aux protéines CAT préalablement liées au premier anticorps, les puits ont été lavés comme précédemment, puis les anti-DIG-POD, soit les anticorps anti-digoxigénine couplés à la peroxydase (dirigés contre les anticorps anti-CAT-DIG) ont été ajoutés aux puits. Finalement, un volume de 200 µl de substrat POD ABTS a été versé dans chaque puits pour révéler la réaction. La lecture des résultats a été effectuée par spectrophotométrie à 405 nm (lecteur de microplaque, modèle 550, Bio-Rad). La quantité de CAT dans 50 µg de protéines contenues dans les extraits cellulaires a été normalisée pour l'efficacité de transfection par l'établissement d'un ratio utilisant l'activité de la β -galactosidase pour chaque échantillon. Ainsi, le niveau de transactivation obtenue, témoignant de l'activité promotrice des LTR, a été défini comme le ratio de la quantité de CAT obtenue (ng/ml) par rapport à l'activité de la β -galactosidase (U/ml). Les résultats obtenus pour le LTR sauvage (LTRs) pré-infection et le LTR mutant (LTRm) post-infection ont été alors comparés entre eux. Des témoins négatifs (i.e. l'utilisation de cellules Cf2Th n'exprimant pas la Tat103 du VIB) ont été aussi prévus. Toutes les transfections ont été réalisées en duplicata, et les expériences ont été répétées trois fois. Les moyennes des ratios ainsi calculés ($\times 100$) ont été comparées par un test T de Student en utilisant un logiciel approprié (Prism, version 3.03, San Diego, CA, U.S.A.).

2.2 Étude de la variabilité génétique du gène accessoire *rev*

La variabilité génétique au niveau des séquences du gène *rev* pré-infection obtenu des cellules infectées avec l'isolat R29 du VIB versus le gène *rev* post-

infection obtenu des cellules infectées avec le variant du VIB a été analysée d'une manière analogue à ce qui a été fait pour les séquences LTR à la différence que le matériel de départ a été les ARN totaux cellulaires qui furent transcrits en ADN.

2.2.1 La réaction de transcription inverse

Les ARN totaux cellulaires (1 µg) obtenus dans la section 1.2 ont d'abord fait l'objet d'une transcription inverse en incubant 1 µg de ces ARN en présence de 1 µl d'inhibiteur RNase (RNAGuard™, GE HeathCare) (39,1 unités/µl), 4 µl de dNTP [(composé de 10 µl d' ATP (adénosine triphosphate), 10 µl de CTP (cytosine triphosphate), 10 µl de GTP (guanine triphosphate), 10 µl de TTP (thymidine triphosphate) et 60 µl d'eau DEPC], 2 µl d'amorce anti-sens Exo3 (20 pmol) (Tableau 2.3) spécifique de l'extrémité 3' des ARNm viraux du VIB, 4 µl de DTT (dithiothréitol; 0,01 M), et 2 µl (200 unités/µl) de l'enzyme transcriptase inverse du virus de la leucémie murine (MLV) (Gibco/Invitrogen) Ensuite, deux incubations ont été effectuées, d'abord pendant 2 h à 37°C, et ensuite pendant 30 minutes à 42°C.

2.2.2 Les réactions de PCR

La séquence du gène *rev* fut obtenue en utilisant deux séries de PCR. Une première réaction de PCR fut réalisée à partir du premier brin d'ADN complémentaire de façon analogue à ce qui a été réalisé pour l'obtention des séquences LTR en utilisant les amorces appropriées (Tableau 2.2). Pour ce faire, 5 µl d'ADNc a été mélangé avec 2 µl des amorces Exo 2 et Exo3, 1 µl de l'enzyme *Taq* DNA polymérase (5 unités/µl) (Qiagen), 5 µl de tampon (Qiagen) 10X, 2 µl de dNTP

et de l'eau DEPC pour un volume total de 50 μ l. Le mélange fut ensuite soumis à 40 cycles d'amplification en utilisant les mêmes conditions de dénaturation, d'hybridation et d'élongation que lors de l'amplification des séquences LTR (voir section 2.1.3). Ce premier produit d'amplification (10 μ l) fut ensuite soumis à une deuxième ronde d'amplification (PCR niché) en utilisant les amorces internes Rev 5' et Rev 3'. Les produits d'amplification ainsi obtenus ont été visualisés sous rayons UV et purifiés sur gel d'agarose 1%.

2.2.3 Le clonage, séquençage et analyse des séquences des produits de PCR

Les produits de PCR obtenus furent clonés dans le vecteur pDrive (Qiagen Cloning kit, Qiagen) en suivant les recommandations du manufacturier. Les clones ainsi obtenus furent analysés par digestion enzymatique avec l'enzyme *EcoR I* qui coupe dans le vecteur, de part et d'autre de l'insert *rev*. Les inserts ont ensuite été séquencés comme précédemment avant de réaliser un alignement des nucléotides des séquences *rev* pré- et post-infection tel que décrit pour les séquences LTR en utilisant le logiciel BioEdit (Hall, 1999).

Amorces	Séquences 5'→3'	Sens	Tm (°C)
LTR BIV 5'	CAA <u>AAGCTT</u> TGTGGGGCAGGGTGGGACC	+	57,2
LTR BIV 3'	CAATCTAGATGTTGGGTGTTCTTCACCG	-	63,7
<u>Restauration 191</u>			
191-F ¹	AGACAGGAAATG <u>T</u> TTATCTTCTCAG	+	49,5
191-R ²	TCAGCTGAGAAGATAAA <u>C</u> ATTTCCTG	-	50,6
<u>Restauration 250</u>			
250-F	CAACCTGATTCA <u>T</u> TAGTGGTT	+	48,9
250-R	TTAACCACTAATGA <u>A</u> TCAGGTTG	-	49,8
<u>Restauration 271</u>			
271-F	GACAACCTGATTCA <u>T</u> TAGTGGT	+	51,4
271-R	CTTAACCACTAATGA <u>A</u> TCAGGTTGTC	-	53,6

Tableau 2.1 Amorces nucléotidiques utilisées pour l'obtention des séquences LTR et pour la restauration des mutations du LTRm du VIB. 1: F pour forward; 2: R pour reverse. Les températures de fusion (Tm) sont indiquées. La base en caractère gras et soulignée représente l'acide nucléique restauré. La séquence complète du génome proviral est retrouvée dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accèsion: NC 001413. Les caractères soulignés représente les sites de restriction pour les enzymes *Hind III* (AAGCTT) et *XbaI* (TCTAGAT), respectivement.

Amorces	Séquences 5'→3'	Sens	Tm (°C)
Exo 2	TAAGAGAGACTCGGCTCGA	+	58,7
Exo 3	CGGCCTAACCACAATCAGC	-	60
Rev 5'	CAAGCGGCGCATGGATGGATCAGG ACCTA	+	71,8
Rev 3'	CAAGGGCCCGTTATTTGTTCCCTG	-	63,3

Tableau 2.2 Amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène *rev* du VIB. La réaction de rétrotranscription fut réalisée avec l'amorce Exo 3, suivi d'une première réaction de PCR avec les amorces Exo 2 et Exo 3. La réaction finale de PCR fut réalisée avec les amorces Rev 5' et Rev 3'. La séquence complète du génome proviral est retrouvée dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accèsion: NC 001413. Les caractères soulignés représente les sites de restriction pour les enzymes *Not I* (GCGGCGC) et *Apa I* (GGGCCCG), respectivement.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Diversité génétique et analyse de l'activité promotrice du LTR

3.1.1 Génération par PCR et vérification sur gel des fragments d'ADN correspondant à la région LTR du génome du VIB

Les ADN des cultures cellulaires témoins et infectées avec la souche de référence R29 du VIB (pré-infection i.e. les cellules ayant servi à l'infection des lapins) et la souche R29 variante du VIB (post-infection i.e. les cellules infectées avec le virus isolé de la rate des lapins quelque 3 ans et demi suivant l'infection) ont été extraits puis assujettis, en se servant d'amorces appropriées, à la technique PCR pour l'obtention des régions complètes des LTR respectifs. Des produits d'amplification de taille comparable de 587 paires de bases ont été obtenus à partir des cellules infectées avec la souche R29 et la souche R29 variante du VIB (Figure 3.1, pistes 2 et 3, respectivement). Aucun produit d'amplification n'a été obtenu à partir de l'ADN des cellules Cf2Th témoins non infectées (Figure 3.1, piste 1).

3.1.2 Analyse des séquences des LTR

Les produits de PCR correspondant aux LTR du VIB furent clonés dans le vecteur pBLCAT3, puis séquencés. Les alignements des séquences complètes (établies à partir d'un nombre minimal de quatre clones) des LTRs (associé au virus sauvage pré-infection) et LTRm (associé au virus post-infection) sont retrouvés dans la Figure

3.2. Les deux séquences LTR ont montré une taille identique de 587 paires de bases. Leur taille est inférieure de deux nucléotides par rapport à celle publiée par Garvey *et al.* (1990) pour le clone 127 du VIB à cause de la délétion de deux résidus de thymine. Ces résidus manquants auraient dus se retrouver entre les positions 482 et 483 des LTRs et LTRm. En plus de cette délétion, une mutation commune aux LTRs et LTRm en position 357 (G→A) fut observée comparativement à la séquence du LTR publiée par Garvey *et al.* (1990).

3.1.3 Activité promotrice des LTR du VIB

Suite à la mise en évidence de trois mutations dans la séquence du LTRm par comparaison avec celle de LTRs, il devenait impératif d'analyser l'impact de ces mutations sur l'activité fonctionnelle promotrice du LTR en utilisant un test de transactivation *in vitro* (St-Louis *et al.* 2005). Pour ce faire, les LTRs et LTRm clonés dans le vecteur plasmidique pBLCAT3 en amont du gène rapporteur CAT furent ensuite utilisés pour transfecter les cellules Cf2Th de concert ou non avec un plasmide pouvant exprimer la Tat103 du VIB et un autre plasmide exprimant la β -galactosidase, ce dernier étant utilisé à des fins, d'une part, d'évaluation de l'efficacité de la transfection et, d'autre part, de normalisation des résultats.

Tel que retrouvé dans la Figure 3.3, le LTRs seul, sans la présence de la protéine Tat, a montré une activité promotrice basale (résultats de trois expériences indépendantes) d'environ deux fois inférieure (1,77 versus 3,20) à $P < 0,001$ à celle obtenue avec le LTRm. Dans la même veine, le LTRs, en présence de la Tat103, a

démontré une activité promotrice moyenne de 12,95. Cette valeur était significativement inférieure ($P < 0,01$) à l'activité promotrice moyenne de 33,50 associée au LTRm. Ainsi, l'activité promotrice du LTRm était de quelque 2,8 fois supérieure à celle du LTRs.

3.1.4 Impact des mutations aux positions 191, 250 et 271 sur l'activité promotrice augmentée du LTRm

Les résultats de transactivation et d'alignement de séquences nous ont porté à émettre l'hypothèse que l'activité promotrice du LTRm puisse être associée à l'une et/ou l'autre des mutations observées aux positions 191, 250 et 271. Dans le but de déterminer quels résidus pouvaient être associés à l'activité promotrice augmentée du LTRm, des mutants dits de restauration (pour revenir au génotype et phénotype sauvage de LTRs) ciblant les mutations seules (191, 250 ou 271), en combinaison de deux (191/250, 191/271 ou 250/271) ou en combinaison de trois (191/250/271) furent générés par mutagenèse dirigée.

Fait important, trois mutations furent observées dans la séquence du LTRm aux positions 191 (T→A), 250 (T→C) et 271 (A→G), par comparaison avec celle du LTRs, résultant en une homologie de 99,5% entre les deux séquences. Fait intéressant, les mutations observées en positions 191 et 250 sont localisées dans le voisinage immédiat des sites de liaison pour les facteurs de transcription prédit *Ets* (résidus 179 à 190) et fonctionnel AP-1 (résidus 243 à 249), respectivement (Fong *et al.* 1995; Tableau 1.2). Par contre, la mutation en position 271 n'est associée à aucun motif

consensus de liaison pour des facteurs de transcription connus ou prédits. Finalement, les deux mutations en positions 250 et 271 sont localisées de part et d'autre d'une séquence contenant un site prédit de liaison pour le facteur de transcription RCE ("Retinoblastoma control element") (résidus 252 à 260).

La figure 3.4 présente l'ensemble des résultats obtenus suite à la comparaison de l'activité promotrice des divers LTR restaurés à celle du LTRs sauvage, cette dernière représentant arbitrairement 100% d'activité promotrice. Tel qu'anticipé, l'activité relative du LTRm fut significativement supérieure (de l'ordre de 212%) à celle du LTRs ($P < 0,001$). Les LTR mutants contenant les réparations simples en positions 191 ou 250, ou la réparation double aux mêmes positions (191/250) ont montré des activités relatives comparables à celle du LTRm (groupe de signification b). Par contre, la triple réparation ciblant l'ensemble des mutations (191, 250 et 271) a permis de revenir à des valeurs comparables à celle obtenue avec le LTRs (groupe de signification a). Ces résultats suggéraient que la guanine en position 271 du LTRm puisse, en combinaison ou non avec les autres résidus en positions 191 et 250, avoir un rôle clé dans l'activité promotrice augmentée du LTRm. Une activité promotrice intermédiaire fut observée avec les LTR mutants associés à la restauration de la position 271 seule ou en combinaison avec la restauration de la position 191 (groupe de signification bc). Ces activités intermédiaires étaient significativement différentes ($P < 0,001$) de celle obtenue avec le LTRs (groupe de signification a) mais non de celles obtenues avec les LTR du groupe de signification b. Par contre, l'activité promotrice du LTR mutant montrant la réparation double aux positions 250 et 271

était comparable à celle obtenue avec le LTRs sauvage (groupe de signification a). L'ensemble des résultats suggère que les deux mutations observées aux positions 250 et 271 étaient responsables de l'activité promotrice augmentée du LTRm.

3.2 Étude de la variabilité génétique du gène accessoire *rev*

3.2.1 Génération par RT-PCR et vérification sur gel des fragments d'ADN correspondant au gène *rev* du VIB

Les ARN totaux des cultures cellulaires témoins et infectées avec la souche de référence R29 du VIB (pré-infection) et la souche R29 variante du VIB (post-infection) ont été extraits, transcrits en ADNc par transcription inverse, puis assujettis, en se servant d'amorces appropriées, à la technique PCR pour l'obtention des régions complètes en acides nucléiques codant pour la protéine Rev du VIB. Des produits d'amplification de taille comparable de quelque 558 paires de bases ont été obtenus à partir des cellules infectées avec la souche R29 et la souche R29 variante du VIB (Figure 3.5, pistes 2 et 3, respectivement). Aucun produit d'amplification n'a été obtenu à partir des ARN des cellules Cf2Th témoins non infectées (Figure 3.5, piste 1).

3.2.2 Analyse des séquences du gène *rev* du VIB

Les produits d'amplification correspondant au gène *rev* du VIB furent clonés dans le vecteur pDrive. Un total de 14 clones du gène *rev* (sept clones associés au VIB pré-infection et sept clones associées au VIB post-infection) furent ensuite séquencés et les acides aminés déduits. L'alignement des séquences consensus en acides nucléiques des gènes *rev* pré-infection (*rev-pr*) et post-infection (*rev-pi*) par

comparaison aux séquences publiées par Oberste *et al.* (1993) et Nadin-Davis *et al.* (1993) est retrouvé dans l'Appendice 1. Les alignements des séquences en acides aminés prédits de la protéine Rev pour les sept clones pré-infection (Rev-pr 1 à 7) et les sept clones post-infection (Rev-pi 1 à 7) sont retrouvés dans l'Appendice 2. Tous les clones séquencés ont démontré la présence de 558 nucléotides et de 186 acides aminés prédits, ce qui est conforme aux séquences rapportées par d'autres auteurs (Oberste *et al.* 1993; Nadin-Davis *et al.* 1993).

La comparaison des séquences consensus en acides aminés des protéines Rev pre- et post-infection avec celles rapportées par Oberste *et al.* (1993) et Nadin-Davis *et al.* (1993), est décrite dans la Figure 3.6. Sur la base de comparaison des séquences consensus obtenues, la séquence consensus de la protéine Rev pre-infection (Rev-pr) a montré 98,4% (trois mutations) et 99,4% (une mutation) d'homologie avec les séquences de la protéine Rev rapportées par Oberste *et al.* (1993) (Rev-ob) et Nadin-Davis *et al.* (1993) (Rev-na), respectivement. Bien que certaines mutations furent localisées de manière aléatoire chez les différents clones obtenus pour les protéines Rev pre- et post-infection (Appendice 2), l'analyse des séquences a pu identifier deux mutations majeures présentes chez tous les clones analysés et retrouvées dans les séquences consensus (Figure 3.6). Ainsi, les acides aminés valine (V) et proline (P) localisés aux positions respectives 48 et 76 de la protéine Rev pre-infection furent substitués, respectivement, par une isoleucine (Ile) et une leucine (L) chez la protéine Rev post-infection. Ces résidus V et P étaient aussi retrouvés dans les séquences Rev-ob et Rev-na. Il est à noter que la position 76 est contenue dans une région contenant

plusieurs arginines (résidus 71 à 80; RARKLP/LGERR où P/L représente la mutation) de la protéine Rev du VIB. Cette région est différente du domaine basique riche en arginine (résidus 92 à 110; EQNRRKQERRLSGLDRRIQ) qui serait responsable de la liaison au motif RRE présent dans tous les transcrits viraux (Oberste *et al.* 1993).

Des alignements de séquences avec les protéines accessoires Tat et Rev du VIB avaient établi que la protéine Tat236 était en fait une protéine hybride composée des premiers 98 acides aminés communs de Tat103 et Tat108 et des derniers 138 acides aminés de Rev (St-Louis *et al.* 2005). Cependant, quelques mutations dans la partie Rev de Tat236 furent observées suite à une comparaison avec la séquence connue de Rev (Oberste *et al.* 1993). Ainsi, les acides aminés lysine (L) et glycine (Gly) aux positions 50 et 63 de Rev-ob sont remplacés par un acide glutamique et l'acide aspartique localisés aux positions 100 et 113 de Tat236 (Appendice 3). De plus, les deux prolines aux positions 76 et 139 et les deux arginines aux positions 107 et 108 de Rev-ob furent substitués par les résidus leucine, sérine, lysine et acide glutamique localisés aux positions 126, 189, 157 et 158 de Tat236, respectivement. Fait remarquable, la leucine localisée à la position 76 de Rev post-infection, suite à sa substitution avec la proline de Rev pré-infection, fut aussi observée dans la partie Rev (position 126) de Tat236. Cela suggère que cette mutation identifiée dans Tat236 et dans Rev post-infection à partir de la souche variante R29 du VIB pourrait avoir un rôle important dans la biogenèse du virus mutant.

Figure 3.1 Produits de PCR préparés à partir d'extraits d'ADN cellulaire total (cellules Cf2Th) et séparés sur gel d'agarose 1% démontrant l'obtention de fragments spécifiques des LTR du VIB. Piste 1: ADN cellulaire total des cellules témoins non infectées; piste 2: ADN cellulaire total des cellules infectées avec la souche R29 du VIB (pré-infection); piste 3: ADN cellulaire total des cellules infectées avec la souche variante R29 du VIB (post-infection). La piste M représente les marqueurs de taille moléculaire d'ADN. La flèche à gauche montre le fragment de 587 pb du LTR amplifié.

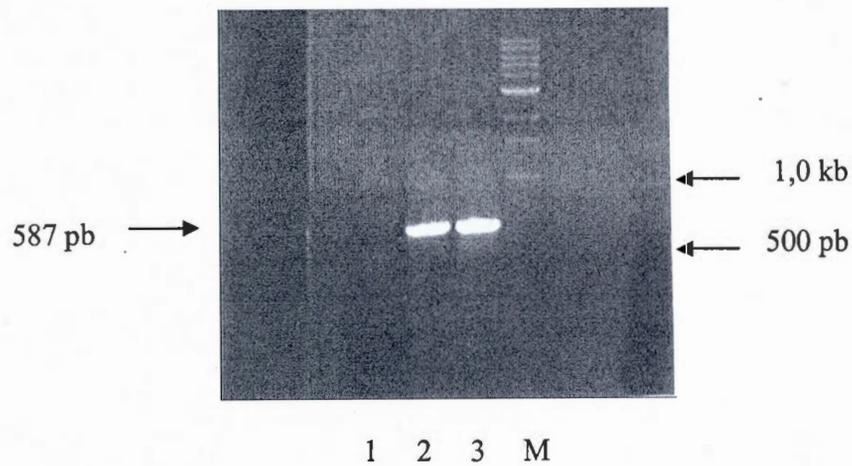


Figure 3.2 Alignement des séquences en acides nucléiques des LTR sauvage (LTRs; pré-infection) et mutant (LTRm; post-infection) du VIB. Trois mutations en positions 191, 250 et 271 sont retrouvées (doublement soulignées et en caractère gras).

```

                                                    50
                                                    |
LTRs GTGGGGCAG GGTGGGACCT CAGGACAACA GCAGCCCCCG GACTTCCCAT
LTRm .....
                                                    100
                                                    |
LTRs ATGTGAATTG GACTGGATCC AGGGAACAAA ATAACCCAGA AGGGGGATTA
LTRm .....
                                                    150
                                                    |
LTRs GACTCTGGGG CTTGGTATGA AGGCCTGAGA GGTTCCTCAGT AGATTGTAAG
LTRm .....
                                                    200
                                                    |
LTRs TCTTCGGCGA GACTGCATGT CTGCACGTAG ACAGGAAATG TTTATCTTCT
LTRm ..... A.....
                                                    250
                                                    |
LTRs CAGCTGATTG TGGTTAGGCC GATTACTGGA AACTAGACAA CCTGATTCAT
LTRm ..... C
                                                    300
                                                    |
LTRs TAGTGGTTAA GATTATGCAT AAGTGCTCGC AATGATGTAG CTGCTTACGC
LTRm ..... G.....
                                                    350
                                                    |
LTRs TTGCTTACTC CGCCCTGAAA CGCCTACCTT AACACGCAAC ACGCCCACCT
LTRm .....

```

400
|
LTRs GTAAGAGTAT ATAAACCATA TCTTCACTCT GACTTTCAGC TCGTGTAGCT
LTRm

450
|
LTRs CATTAGCTCC GAGCTCCCCA ACCTACAGCC TGAGAGGCAC TGGCTCGGTT
LTRm

500
|
LTRs GGGTAGCCAG CCTTTCGGGT AATAAAGGCT TGGGCATTCG GCATCTACCC
LTRm

550
|
LTRs GTGCCTCCTG TCTTGTCTTA CTCGAGCGAA CCCACAATC CGTCCTGCTG
LTRm

587
|
LTRs AGCTCACAGC TCGCGGGGCG GTGAAGAACA CCCAACA
LTRm

Figure 3.3 Analyse *in vitro* de l'activité promotrice des LTR sauvage (LTRs) et mutant (LTRm) en utilisant un test de trans-activation CAT (choramphénicol-acétyl-transférase). Les cellules Cf2Th furent transfectées avec les vecteurs pBLTRCAT seuls (1 µg) avec ou sans un plasmide (1 µg) exprimant la Tat103 du VIB sous le contrôle du promoteur CMV. Dans tous les essais de transfection, un plasmide additionnel (1 µg) exprimant la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV fut utilisé pour apprécier l'efficacité de transfection et pour normaliser les données obtenues. Les cellules furent récoltées 48 heures suivant la transfection, et 50 µg d'un extrait cellulaire fut utilisé pour le dosage des protéines, de la β-galactosidase et de l'enzyme CAT (test ELISA). Les résultats furent exprimés comme étant la moyenne des ratios (calculés à partir de trois expériences indépendantes, deux échantillons pour chaque expérience) de la quantité de CAT (ng/ml) versus l'activité de la β-galactosidase (U/ml) (x 100). Les barres verticales représentent l'écart-type de la moyenne. Les * et ** représentent une différence significative à P < 0,01 entre les activités basales du LTRm versus celle du LTRs et à P < 0,001 entre les activités du LTRm + Tat103 versus celle du LTRs + Tat103, respectivement.

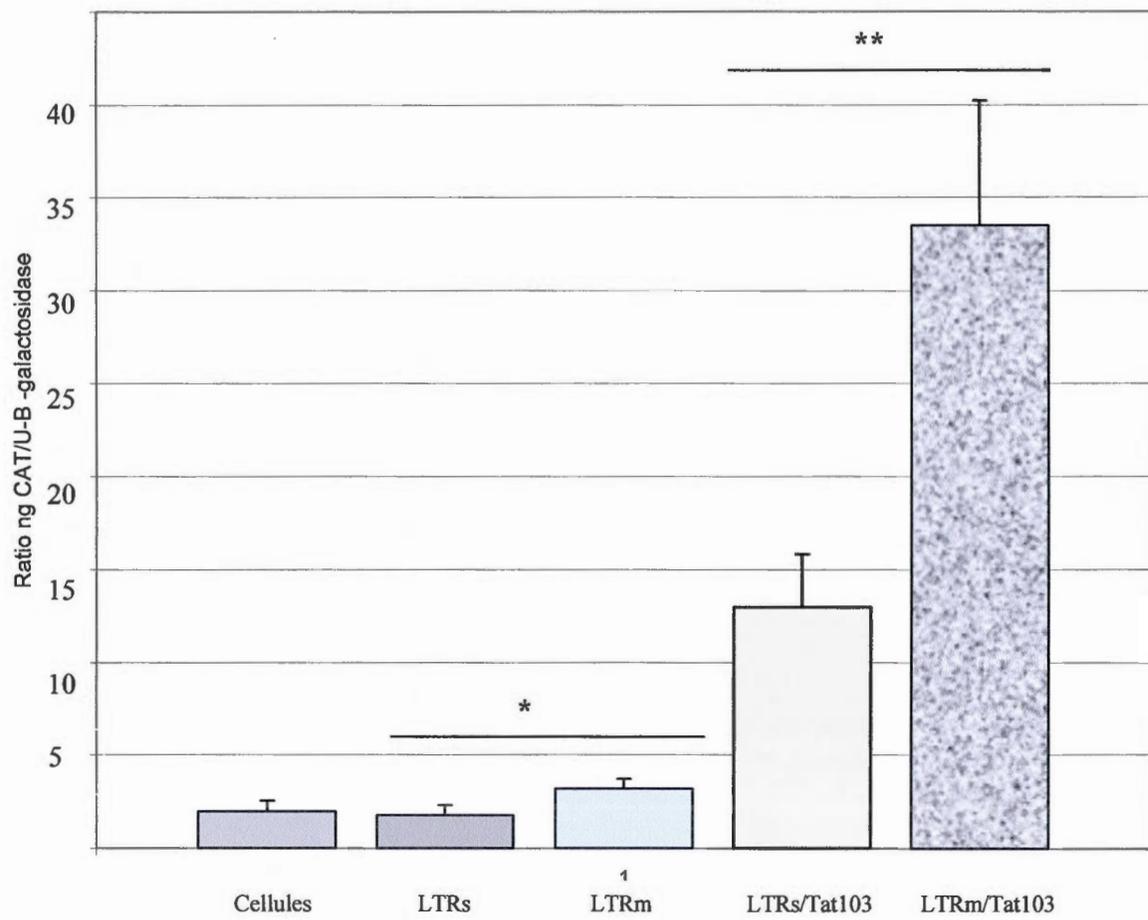


Figure 3.4 Analyse *in vitro* de l'activité promotrice des LTR du VIB restaurés (à partir de LTRm) au génotype sauvage (LTRs) en utilisant un test de trans-activation CAT (choramphénicol-acétyl-transférase). Les cellules Cf2Th exprimant constitutivement la Tat103 du VIB sous le contrôle du promoteur CMV furent transfectées avec chacun des vecteurs plasmidiques (1 µg) arborant les génotypes sauvages (LTRs), mutant (LTRm) ou restaurés (LTRm-191, LTRm-250, LTRm-271, LTRm191-250, LTRm191-271, LTRm250-271 et LTRm-191-250-271) du LTR du VIB. Les numéros 191, 250 et 271 dans les constructions représentent la restauration au génotype sauvage à ces positions de la séquence du LTR. Dans tous les essais de transfection, un plasmide additionnel (1 µg) exprimant la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV fut utilisé pour apprécier l'efficacité de transfection et pour normaliser les données obtenues. Les cellules furent récoltées 48 heures suivant la transfection, et 50 µg d'un extrait cellulaire furent utilisés pour le dosage des protéines, de la β-galactosidase et de l'enzyme CAT (test ELISA). Les quantités de CAT (ng/ml) obtenues (quatre expériences, deux échantillons par expérience) furent normalisées par rapport à l'activité (U/ml) de la β-galactosidase par le calcul des ratios CAT/β-galactosidase. Les données furent exprimées comme étant la moyenne des % de l'activité promotrice de chacune des constructions LTRm relative à l'activité promotrice de LTRs (établie à 100%). Les barres verticales représentent l'écart-type de la moyenne. Les lettres a, et b représentent des groupes différents significativement entre eux à $P < 0,001$. Les lettres bc représentent des groupes différents significativement de ceux du groupe à ($P < 0,001$) mais non différents du groupe b.

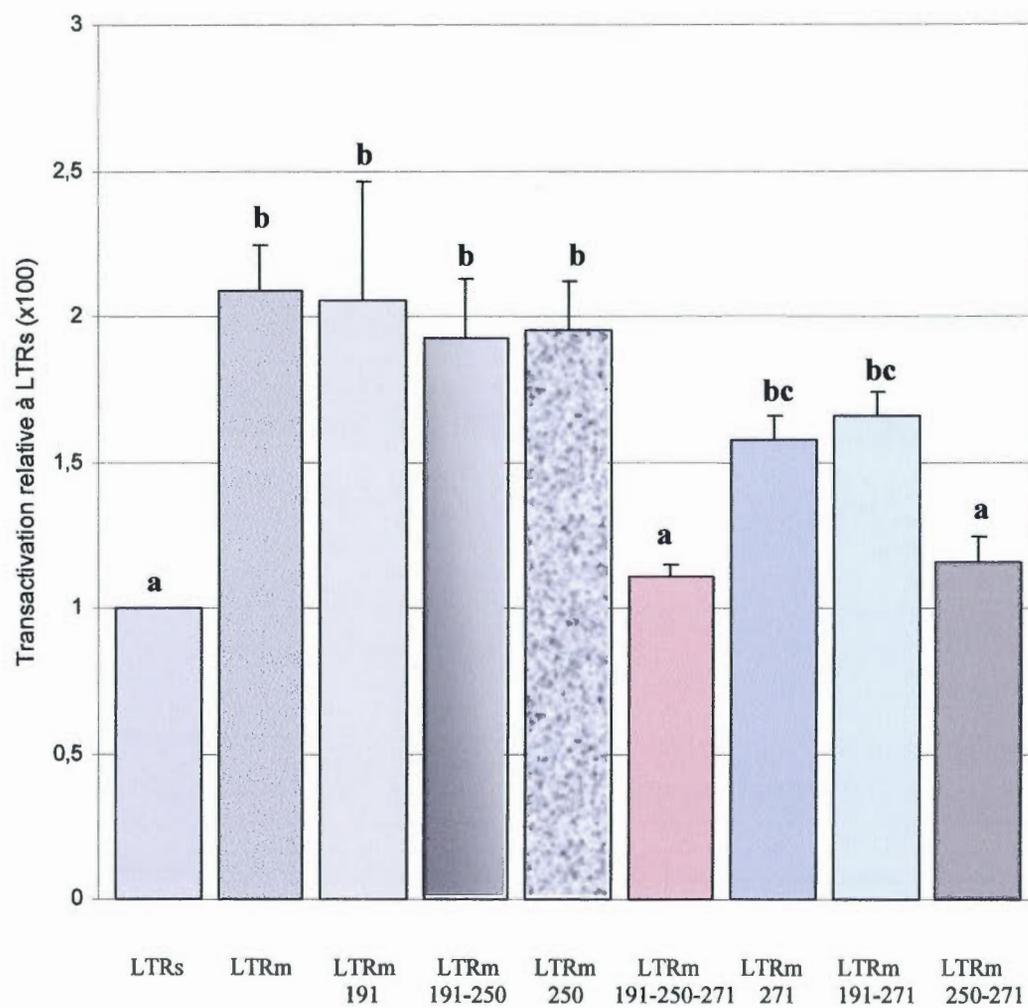


Figure 3.5 Produits de RT-PCR préparés à partir d'extraits d'ARN cellulaire total (cellules Cf2Th) et séparés sur gel d'agarose 1% démontrant l'obtention de fragments spécifiques du gène *rev* du VIB. Piste 1: ARN cellulaire total des cellules témoins non infectées; piste 2: ARN cellulaire total des cellules infectées avec la souche R29 du VIB (pré-infection); piste 3: ADN cellulaire total des cellules infectées avec la souche variante R29 du VIB (post-infection). La piste M représente les marqueurs de taille moléculaire d'ADN. La flèche à droite montre le fragment de 558 pb du gène *rev* amplifié.

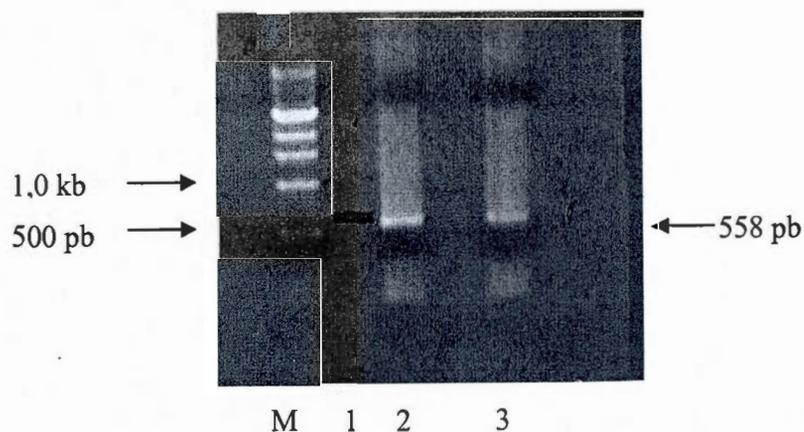


Figure 3.6 Alignement des séquences en acides aminés de la protéine Rev du VIB. Comparaison des séquences consensus en acides aminés de Rev pré-infection (Rev-pr) et post-infection (Rev-pi) avec celles publiées par Oberste *et al.* (1993) (Rev-ob) et Nadin-Davis *et al.* (1993) (Rev-na) portant les numéros de référence M74712 et L06504 de la banque de données GenBank, respectivement. La dernière ligne représente la portion Rev de la protéine Tat236 (St-Louis *et al.* 2005).

					50
Rev-ob	MDQDLRAER	GERGGGSEEL	LQEEINEGRL	TAREALQTWI	NNDSPRYVKK
Rev-naE.....	...K.....
Rev-prK.....
Rev-piI..
Tat236/Rev	-----	-----	-----	-----	-----E
					100
Rev-ob	LRQGQPELPT	SPGGGGGRGH	RARKLPGERR	PGFWKSLREL	VEQNRKQER
Rev-naK...	..D.....
Rev-prK...	..D.....
Rev-piD.....L...
Tat236/RevL...
					150
Rev-ob	RLSGLDRRIQ	QLEDLVRHMS	LGSPDPSTPS	ASVLSVNPPA	QTPLGHLPPR
Rev-naK.....
Rev-pr
Rev-pi
Tat236/RevKE..S.
					186
Rev-ob	SYFKLKRVC	GAGWDLRTTA	APGLPICELD	WIQGTK	
Rev-na	
Rev-pr	
Rev-pi	
Tat236/Rev	

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 La diversité génétique: une particularité chez les virus à ARN

Les virus à ARN sont caractérisés par une plasticité génétique peu commune qui leur a permis d'évoluer de façon remarquable depuis des centaines de millions d'années (Domingo *et al.* 2006; Gorbalenya *et al.* 2006). Il semble que cette capacité d'évoluer est loin d'être terminée suite à la découverte récente de virus émergents (par exemple le coronavirus du syndrome respiratoire aigü sévère, le virus Nipah) ou encore de virus connus qui émergent de nouveau sous une autre forme, comme par exemple la souche H5N1 du virus de l'influenza aviaire. En plus d'acquérir des propriétés antigéniques nouvelles, supposant par le fait même la vulnérabilité immunitaire de la population devant être exposée, certains de ces virus ont acquis la capacité de franchir la barrière des espèces ce qui inévitablement pourra engendrer de nouvelles infections jamais répertoriées jusqu'à ce jour chez l'homme et les animaux.

Les rétrovirus ne font pas exception à la règle et le VIH qui fait des ravages depuis plus de 25 ans maintenant en est l'exemple typique chez l'homme. En effet, la diversité génétique rapportée chez ce virus a permis d'identifier et de caractériser une multitude de variants viraux auxquels ont été associées des pathologies variées. Plus près de nous, un variant viral fut isolé de la rate de lapins quelque trois ans et demi suivant leur infection avec la souche R29 du VIB (St-Louis *et al.* 2005). En effet, ces

auteurs ont mis en évidence, au niveau des cellules infectées avec ce variant du VIB, un ADNc codant pour une nouvelle protéine accessoire et régulatrice de la transcription appelée Tat236. Cette protéine est constituée des premiers 98 acides aminés des Tat103 et Tat108 déjà rapportées et des derniers 136 acides aminés de la protéine Rev du VIB. En plus de prédire un nouveau mécanisme d'épissage pour la génération du transcrit correspondant, la Tat236 a montré, dans un test *in vitro* de transactivation mettant à profit le gène rapporteur CAT placé sous le contrôle du LTR du VIB, une activité trans-activatrice nettement supérieure (jusqu'à 350%) à celle obtenue avec les protéines Tat103 et Tat108. Ces résultats suggèrent ainsi une évolution temporelle du virus *in vivo* dans le cadre d'une infection chronique au niveau de sa fonction Tat. Sur la base des résultats en égard de la Tat236, nous avons voulu déterminer si semblable évolution et/ou diversité génétique pouvait aussi avoir eu lieu au niveau des deux autres séquences connues pour réguler l'expression génique du VIB, en l'occurrence au niveau de la région du LTR et au niveau du gène accessoire *rev*.

4.2 La diversité génétique dans la région LTR du VIB

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré la présence de trois mutations aux positions 191, 250 et 271 au niveau de la séquence du LTRm obtenue à partir d'un variant du VIB isolé de la rate de lapins quelque trois ans et demi suivant leur infection. Par analogie avec la variation génétique rapportée par d'autres auteurs pour les gènes *env* et *pol* (Suarez et Whestone, 1997), ces résultats montrent une évolution génétique *in vivo* pour le VIB au niveau de la région LTR de son génome. Il

est permis de penser que cette diversité génétique du virus aurait pu se produire *in vitro* suite à une adaptation sur cultures cellulaires suivant à son isolement. Par contre, cette possibilité peut pratiquement être exclue à cause du faible nombre de passages viraux (n = 3) sur cultures cellulaires avant d'amplifier la région du LTR.

Mes résultats viennent de plus supporter ceux de St-Louis *et al.* (2005) qui ont rapporté chez le même variant du VIB une évolution génétique au niveau du gène *tat* par l'identification d'un ARNm codant pour la protéine hybride Tat/Rev appelée aussi Tat236. Le fait que cet ARNm fut mis en évidence de façon concomitante avec celui codant pour la Tat103 suggère par le fait même la présence de quasi-espèces au niveau de la population virale (St-Louis *et al.* 2005; Domingo *et al.* 2006). Par contre, ce concept de quasi-espèces au niveau de la région du LTR originant du variant viral ne fut pas observé dans mon travail, du moins au sein de la population virale obtenue *in vitro*, puisque tous les clones séquencés du LTRm arboraient la même séquence en acides nucléiques. L'obtention et le séquençage d'un plus grand nombre de clones pourraient confirmer ou infirmer cette observation.

La présence des trois mutations au niveau du LTRm pouvait supposer une activité promotrice différente de celle du LTRs sauvage. En utilisant un test de transactivation *in vitro* médiée par la protéine Tat103 et en ayant comme gène rapporteur le gène CAT, il fut clairement démontré que le LTRm médiait une activité promotrice significativement augmentée (jusqu'à 250%) lorsque comparée à celle obtenue avec le LTR sauvage. Cette activité promotrice augmentée a aussi été

obtenue au niveau des cellules sans l'apport de la protéine Tat103. Cela suggère que l'activité augmentée du LTRm se situerait au niveau basal du promoteur, ce qui pourrait aussi expliquer son activité augmentée en présence de la protéine Tat103. Une semblable augmentation de l'activité basale du promoteur du LTR a aussi été rapportée chez des variants du VIH avec comme résultante une augmentation de l'expression des gènes viraux authentiques dans son ensemble (Krebs *et al.* 1998). De plus, la variation génétique alliée ou non avec une activité promotrice altérée du LTR fut corrélée avec le caractère pathogénique particulier de certaines souches du VIH et/ou leur tropisme cellulaire au niveau même des organes affectés, d'où la diversité des pathologies engendrées avec ces variants viraux dépendamment du lieu de réplication du virus ou de ses variants (Krebs *et al.* 2002). À l'inverse toutefois, des modifications épigénétiques sélectives au niveau du LTR du VIH-1 en corrélation avec un évènement d'hyperméthylation tant *in vivo* que *in vitro* pourraient être des mécanismes importants par lesquels l'activité du provirus est affectée négativement, voire supprimée, ce qui aurait comme résultante une atténuation des souches virales (Ishida *et al.* 2006).

Les résultats obtenus dans ce travail rejoignent ceux d'une autre étude où une variation génétique fut observée au niveau de la région LTR du EIAV (le lentivirus équin), en corrélation avec l'altération du tropisme cellulaire du virus *in vitro* (Maury *et al.* 2005). De plus, les niveaux d'augmentation (de l'ordre de 350%) obtenus avec le LTR mutant du EIAV étaient comparables à ceux obtenus dans ce travail avec le VIB. Quoiqu'il en soit, il serait important, dans des travaux ultérieurs, de déterminer

l'activité de LTRm dans le cycle de réplication du VIB. Pour cela, le LTRm pourrait être permuté à la place du LTRs dans un clone infectieux du VIB (Garvey *et al.* 1990). Par la suite, des essais de transfection avec le clone muté du VIB pourraient être réalisés pour déterminer, dans un premier temps, la capacité du LTRm de permettre la réplication du virus tel qu'analysé par la production de syncytia cellulaires (St-Louis *et al.* 2004) et, dans un deuxième temps, estimer la quantité de virus produits en utilisant un ELISA de capture contre la p26 du VIB (Archambault *et al.* 1989) et/ou un test de dosage de l'activité de la transcriptase inverse à partir des surnageants des cultures cellulaires infectées (Kashanchi *et al.* 1991).

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient généralement à une séquence précise de l'ADN et qui interviennent dans le processus de transcription. Ils peuvent notamment agir au niveau de la condensation de la chromatine, de l'initiation de la transcription et de l'élongation des transcrits (Carey et Smale, 2000). Généralement, les facteurs de transcription sont composés de deux domaines distincts: l'un est nécessaire à la liaison à l'ADN et l'autre est associé à l'activité transcriptionnelle. Certains facteurs possèderaient également des domaines supplémentaires, dits coopératifs, qui permettent une interaction synergique avec d'autres facteurs de transcription (Carey et Smale, 2000). Chez les lentivirus, le LTR est un élément clé dans l'expression virale (Krebs *et al.* 2002). La région du LTR contient en outre des motifs de liaison aux facteurs cellulaires de transcription qui sont généralement situés dans la région U3 en amont du site de transcription délimitant le début de la région R du LTR.

Plusieurs sites de liaison ont été décrits dans la région U3 du LTR du VIH-1, incluant ceux pouvant se lier aux facteurs NF- κ B (deux copies de 10 paires de base faisant partie du "enhancer") et Sp-1 (trois motifs consécutifs riches en résidus GC situés en 5' de la boîte TATAA) qui régulent positivement la transcription. D'autres motifs de liaison ont aussi été décrits en 5' de la région U3, responsables de réguler négativement cette fois la transcription virale (Krebs *et al.* 2002). Chez le VIB, plusieurs motifs de liaison à une variété de facteurs de transcription ont aussi été prédits (Garvey *et al.* 1990) dans la région U3 du LTR, certains ayant été encore rapportés ultérieurement comme étant fonctionnels (Fong *et al.* 1995). Parmi ceux-ci se retrouvent les motifs de liaison à NF- κ B, GRE ("Glucocorticoid-responsive element"), AP-4, AP-1, CAAT et ATF/CREB qui activent le LTR durant la transcription basale et durant celle activée par la protéine Tat. De plus, les motifs de liaison à AP-4 et au facteur Sp-1 (trois motifs comme le VIH-1) ont des effets sur l'activité du LTR dépendamment du type de cellules et de l'activation par la protéine Tat (Fong *et al.* 1995). Finalement, le même groupe de chercheurs a mis en évidence des séquences dans la région U5 du LTR et les séquences adjacentes non traduites qui inhibent plutôt l'activité du LTR du VIB (Fong *et al.* 1995).

Dans cette présente étude, l'ensemble des résultats a montré que l'activité promotrice augmentée de LTRm serait due aux substitutions de bases aux positions 250 et 271. Par contre, aucune corrélation ne fut observée entre cette activité augmentée et la mutation à la position 191. Le résidu 191 est immédiatement contigu à un motif prédit de liaison au facteur *Ets* (localisé aux positions 179 à 190). Le motif

de liaison *Ets* est notamment retrouvé au niveau de promoteurs de gènes tumoraux (par exemple le gène TbetaR-II) dont leur régulation peut se faire via la liaison de ce motif à divers membres de la famille des facteurs cellulaires *Ets* (*Ets1*, *Ets2*, PEA3, Elf3 et PU.1) (Kopp *et al.* 2004). Le motif de liaison au facteur *Ets* est aussi présent au niveau du LTR du VIH-1 (Krebs *et al.* 2001) et sa fonction de moduler positivement la fonction promotrice du LTR du VIH-1 et du VIH-2 a été établie (Schwarzenbach *et al.* 1995; Bassuk *et al.* 1997), ce qui n'est pas le cas chez le VIB. Quoiqu'il en soit, il est clair, à la lumière des résultats obtenus, que la mutation au niveau du site de liaison prédit *Ets* n'a eu aucune influence sur l'activité promotrice augmentée du LTRm puisque le retour au génotype sauvage à cette position n'a pu résulter en un retour d'activité au niveau de celui du LTRs sauvage. Bien que ce résultat ne semble pas supporter un rôle pour le site *Ets* pour l'activité promotrice de LTRm, des expériences d'empreinte à l'ADN ("DNA footprinting") (Pastorcic et Das, 1999) et de liaison par un test de changement de mobilité sur gel (ADN du LTR/protéine *Ets*) (Archambault *et al.* 2005) devraient être conduites pour caractériser ce site de liaison en vue de déterminer une fonction même de ce dernier dans l'activité promotrice du LTRs sauvage du VIB. Des expériences complémentaires de mutagenèse au niveau de ce site de liaison prédit, combinées à des tests de transactivation *in vitro* pour en apprécier leur impact devraient aussi être conduites pour confirmer, s'il y a lieu, une fonction du site de liaison *Ets* dans le LTR du VIB.

Une restauration complète de l'activité promotrice du LTRm au niveau de celle du phénotype sauvage fut obtenue suite aux réparations des positions 250 et 271. La position 250 est localisée à un nucléotide en aval du motif de liaison pour le facteur de transcription AP-1 (composé des résidus TGATTCA aux positions 243 à 249) et à deux nucléotides en amont du motif de liaison prédit pour le facteur RCE (composé des résidus AGTGGTTAA aux positions 252 à 260) (Garvey *et al.* 1990; Fong *et al.* 1995). La position 271, quant à elle, est localisée à dix nucléotides en aval du motif de liaison prédit pour le facteur RCE, à huit nucléotides en amont de la boîte CAAT localisée aux positions 280 à 284 et à treize nucléotides en amont du site de liaison au complexe de transcription ATF/ CRE (pour "Activating Transcription Factor/Camp Response Element" composé des résidus GATGTAG) localisé aux positions 285 à 291 du LTR du VIB (Garvey *et al.* 1990, Fong *et al.* 1995). Fait intéressant, la mutation localisée à la position 271 semble être d'une grande importance pour l'activité promotrice augmentée du LTRm comme en font foi les résultats de restauration partielle de l'activité (niveau intermédiaire entre ceux de LTRm et LTRs) promotrice vers le phénotype sauvage lorsque cette position fut réparée dans les constructions double 191/271 ou simple 271. Ce n'est que suite à la réparation double en positions 271 et 250 que le phénotype sauvage fut de nouveau obtenu, sans égard à la mutation observée en position 191.

Diverses possibilités peuvent être avancées pour expliquer l'effet des mutations aux positions 250 et 271 sur l'activité promotrice du LTR du VIB. Tel que mentionné, les mutations ont eu lieu dans le voisinage d'éléments participant à la

transcription tels AP-1 et ATF/CRE et la boîte CAAT. Puisque la réparation unique de la position 271 a résulté en une restauration partielle de l'activité promotrice du LTR, il est permis de penser que les réparations doubles auraient pu agir en synergie pour revenir au phénotype sauvage de l'activité promotrice du LTR. Ainsi, les changements de résidus peuvent avoir eu comme résultante une augmentation de l'affinité de facteurs de transcription tels les facteurs AP-1 et ATF/ CRE à leurs motifs de liaison respectifs, ou encore induire indirectement une activité accrue de la boîte CAAT qui normalement, positionnée en amont du début de la transcription, favorise cette dernière (Kawai *et al.* 2003). Un mécanisme d'activité synergique semblable a notamment été rapporté entre le facteur ATF/CRE et la boîte GC dans l'expression d'un gène cellulaire endogène (gène codant pour la sous-unité Na, K-ATPase alpha 1) (Kobayashi et Kawakani, 1997). Une interprétation inverse peut aussi être considérée dans le sens où les résidus présents aux positions 250 et 271 dans le génotype sauvage pourraient avoir un régulateur négatif au niveau des autres éléments impliqués dans la transcription, analogue à ce qui est observé avec certaines séquences du VIH localisée dans la partie 5' du LTR (Krebs *et al.* 2002). Dans le cas du VIB, cette régulation négative au niveau du LTRs pourrait se faire via le motif de liaison RCE ("Retinoblastoma control element) situé entre les positions 250 et 271 qui furent l'objet des mutations. Le motif RCE qui est rencontré fréquemment dans l'élément régulateur d'oncogènes cellulaires et de gènes codant pour des facteurs de croissance, a en outre comme ligand la protéine Rb ("Retinoblastoma") qui forme avec le facteur E2F le complexe Rb-E2F qui réprime l'expression des gènes du cycle cellulaire et, conséquemment, supprime la prolifération cellulaire (Galderisi *et al.*

2006). De plus, le gène codant pour un facteur ressemblant au facteur de croissance à l'insuline chez le rat contient dans son promoteur une région "silencer" qui contient le motif RCE, ce qui régulerait négativement l'expression de ce gène (Kutoh *et al.* 1999). Ainsi, les mutations 250 et 271 auraient pu avoir comme conséquence un dérèglement au niveau du motif de liaison RCE (baisse ou perte d'affinité d'un facteur de transcription correspondant) pouvant réguler négativement le promoteur du LTR, résultant alors en une augmentation concomitante de l'activité promotrice du LTRm.

4.3 La diversité génétique dans le gène *rev* du VIB

Les résultats obtenus ont démontré une homologie de 98,4% entre la séquence séquence Rev pre-infection et celle publiée par Oberste *et al.* (1993), alors qu'elle est de 99,46% avec la séquence rapportée par Nadin-Davis et ses collaborateurs (1993). Bien que toutes ces séquences originent de la souche R29 du VIB, ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où le VIB sauvage propagé sur cellules Cf2Th (Bouillant *et al.* 1989) était le même que celui utilisé par Nadin-Davis *et al.* (1993).

Deux mutations conservées parmi tous les clones séquencés furent observées aux positions 48 (V → I) et 76 (P → L) du gène *rev* post-infection lorsque comparée avec la séquence du gène *rev* pré-infection. Bien que ces mutations ne soient pas localisées dans des domaines précis, elles pourraient avoir un effet sur la fonction de la protéine Rev ou dans le mécanisme qui lui est associée. Par exemple, ces mutations pourraient être localisées dans les domaines de multimérisation de Rev qui, bien que

non définis chez le VIB, sont primordiaux dans le rôle de Rev afin d'assurer un transport efficace des transcrits viraux tardifs du noyau vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines (St-Louis *et al.* 2004). De plus, la mutation à la position 76, qui fut aussi rapportée dans la partie Rev de la protéine Tat236 (isolée du même variant du VIB R29), sans pour autant en savoir l'implication (St-Louis *et al.* 2005), se situe dans une région contenant des résidus chargés arginines (résidus 71 à 80; RARKLP/LGERR où P/L représente la mutation $P \rightarrow L$), ce qui pourrait avoir un effet bénéfique au niveau de la liaison de Rev au REE des transcrits viraux (Oberste *et al.* 1991, 1993; St-Louis *et al.* 2004). Toutefois, aucune fonction Rev n'a encore été associée à ce dernier domaine chez le VIB. Si ce domaine est fonctionnel, l'effet de ce dernier sur la liaison au RRE pourrait être additif à celui associé au domaine prédit riche en arginine de Rev qui est localisé entre les résidus 92 à 110 (EQNRRKQERRLSGLDRRIQ) de la protéine. Cette possibilité en égard de la présence de deux domaines de Rev pour lier l'ARN serait alors compatible avec la présence de deux domaines fonctionnels non contigus de Rev du EIAV qui sont impliqués dans la liaison de la protéine au RRE des transcrits viraux (Lee *et al.* 2006). Quoiqu'il en soit, des expériences doivent être réalisées afin de déterminer la signification des mutations observées dans la réplication du VIB. Ainsi, des expériences visant à déterminer la force de liaison (affinité) au RRE par la technique de gel de retardement en utilisant des conditions stringentes pour la liaison pourraient être réalisées (Archambault *et al.* 2005). D'autres expériences pourraient aussi être réalisées pour évaluer la capacité de Rev mutée de pouvoir assurer et augmenter le transport des transcrits viraux. Cela pourrait être réalisé par exemple en transfectant

des cellules avec des plasmides pouvant générer des transcrits contenant le RRE et la séquence codante pour le gène *gag*, d'une part, et produire les protéines Rev d'intérêt, d'autre part. Ainsi, une augmentation de la production de Gag (révélée par un test de Western blot semi-quantitatif par rapport à une protéine endogène telle la β -actine en utilisant un appareil de densitométrie) pourrait être associée à une capacité accrue du transcrit correspondant du noyau vers le cytoplasme. Finalement, l'introduction des mutations décrites pourrait être introduite dans un clone infectieux du VIB (Garvey *et al.* 1990) en vue d'analyser leur impact dans l'expression et la production virale.

CONCLUSION

Le VIB est un lentivirus dont la variabilité génétique au niveau des gènes accessoires était peu connue en début de ce projet. Une étude récente conduite dans notre laboratoire avait rapporté un variant du VIB qui fut isolé de lapins quelque trois ans et demi suivant leur infection (St-Louis *et al.* 2005).

Dans ce présent travail, nous avons étudié la variation génétique au niveau de deux séquences impliquées dans la régulation de l'expression génique du virus, soit la région LTR et le gène *rev*. Nous avons découvert que le virus mutant obtenu en cours d'infection chronique chez le lapin (St-Louis *et al.* 2005) arborait une séquence mutante LTR dotée d'une activité promotrice augmentée par rapport à la séquence du virus sauvage (non muté) qui avait servi aux infections des animaux. Les résultats ont aussi montré que les mutations en positions 250 et 271 du LTR semblent être responsables de cette activité augmentée. Ces recherches sont importantes puisqu'un virus mutant du VIB pourrait dérégler davantage le système immunitaire de l'hôte qui serait alors plus susceptible aux infections de nature secondaire. D'ailleurs, des séquences mutées au niveau du LTR du VIH (un lentivirus, tel que mentionné, apparenté au VIB) ont eu un impact majeur sur l'expression génique et/ou la pathogénicité/virulence des virus mutants (Ishida *et al.* 2006). De plus, une corrélation entre des mutations dénotées au niveau de Rev et la progression de la maladie chez des chevaux infectés avec l'EIAV fut rapportée par Belshan *et al.* (1998, 2001), ce qui est en conformité donc avec la présence de deux grandes sous-

populations de virus génotypiquement différentes au niveau du gène *rev* qui co-existent *in vivo* et qui sont phénotypiquement différents au niveau de la pathologie engendrée (Baccam *et al.* 2003).

Le mutant du VIB R29 qui a servi à notre étude ne pourrait qu'être le reflet d'une adaptation du virus chez le lapin infecté d'autant plus qu'aucune pathologie ne fut décelée chez ces animaux pendant toute la durée de l'expérience (trois ans et demi) (St-Louis *et al.* 2005). Ainsi, il serait important de vérifier si des variations génétiques au niveau des gènes régulant l'expression génique du VIB (séquence LTR et gènes *tat* et *rev*) puissent être observées chez son hôte naturel qu'est le bovin dans le cadre d'infections expérimentales. Finalement il serait aussi intéressant de déterminer le caractère pathogénique du variant du VIB R29 ou le virus Jembrana, de tout autre variant du VIB chez le bovin. Cela est important dans la mesure où un autre lentivirus bovin, le virus Jembrana qui est génétiquement relié de très près au VIB R29, induit des taux de mortalité de plus de 40% chez les bovins dans les deux semaines suivant l'infection (Chadwick *et al.* 1995). Ainsi, l'émergence de variants de VIB pourrait avoir des répercussions pathologiques semblables avec, comme conséquence, un impact économique important pour toute l'industrie bovine tant au niveau de la santé globale des animaux qu'à celui du marché des exportations.

APPENDICE 1

Alignement des séquences consensus en acides nucléiques du gène *rev* obtenues en pré-infection (*rev-pr*) et post-infection (*rev-pi*) en comparaison avec les séquences publiées de Oberste *et al.* (1993) (*Rev-ob*) et Nadin-Davis *et al.* (1993) (*Rev-na*).

					50
rev-ob	ATGGATCAGG	ACCTAGACCG	CGCGGAACGC	GGGGAAAGGG	GAGGAGGATC
rev-naA..
rev-pr
rev-pi
					100
rev-ob	CGAAGAACTG	CTTCAGGAGG	AGATCAACGA	AGGGAGGCTG	ACAGCCAGAG
rev-na
rev-pr
rev-pi
					150
rev-ob	AAGCTTTACA	AACATGGATC	AATAATGATT	CTCCTAGGTA	TGTTAAGAAG
rev-naC....
rev-prC....
rev-piC....
					200
rev-ob	CTGCGCCAAG	GTCAGCCAGA	ATTACCAACA	TCTCCCGGCG	GAGGAGGAGG
rev-naA.A..
rev-prA..
rev-piA..
					250
rev-ob	ACGGGGACACA	GAGCCAGAAA	GCTCCCCGGC	GAGAGGAGA	CCGGCTTCTG
rev-na
rev-pr
rev-piT....
					300
rev-ob	GAAGTCTCTA	CGAGAATTG	GTTGAACAAA	ATAGGAGAAA	GCAAGAACGA
rev-na
rev-pr
rev-pi

350
|
rev-ob CGCCTATCGG GTCTGGACAG AAGAATACAA CAGCTTGAGG ATCTTGTTCCG
rev-na A.A.
rev-pr A.
rev-pi A.

400
|
rev-na CCACATGTCG CTGGGATCTC CTGACCCCTC AACTCCTTCA GCTTCCGTTCC
rev-ob
rev-pr
rev-pi

450
|
rev-ob TTTCTGTTAA CCCTCCTGCT CAAACTCCTT TGGGACATCT TCCGCCACGC
rev-na
rev-pr
rev-pi

500
|
rev-ob TCCTATTTTA AACTTAAAAG GGTGGACTGT GGGGCAGGGT GGGACCTCAG
rev-na
rev-pr
rev-pi

550
|
rev-ob GACAACAGCA GCCCCCGGAC TTCCCATATG TGAATTGGAC TGGATCCAGG
rev-na
rev-pr
rev-pi

558
|
rev-ob CAAACTCC
rev-na
rev-pr
rev-pi

APPENDICE 2

Alignement des séquences en acides aminés de la protéine Rev obtenues à partir de sept clones plasmidiques pré-infection (Rev-pr1 à Rev-pr7) et de sept clones plasmidiques post-infection (Rev-pi1 à Rev-pi7) en comparaison avec les séquences publiée de Oberste *et al.* (1993) (Rev-ob) et Nadin-Davis *et al.* (1993) (Rev-na). La portion Rev de la protéine Tat236 est aussi représentée (St-Louis *et al.* 2005).

		50
Rev-ob	MDQDLDR AERGERGGGSEELLQEEINEGRLTAREALQ TWINNDS PRYVKK	
Rev-naE.....K.....	
Rev-pr1K.....	
Rev-pr2E.....K.....I..	
Rev-pr3K.....	
Rev-pr4K.....	
Rev-pr5E.....K.....I..	
Rev-pr6E.....	
Rev-Pr7E.....K.....	
Rev-pi1I..	
Rev-pi2I..	
Rev-pi3I..	
Rev-pi4I..	
Rev-pi5I..	
Rev-pi6I..	
Rev-pi7I..	
Tat236/	-----E	
Rev		
		100
Rev-ob	LRQGPPELPTSPGGGGGRGHRARKLPGERRPGFWKSLRELVEQNRRKQER	
Rev-naK.....D.....	
Rev-pr1K.....D.....	
Rev-pr2K.....D.....Y.T...DK.....R.....	
Rev-pr3D.....	
Rev-pr4D.....	
Rev-pr5K.....D.....Y.T...DK.....R.....	
Rev-pr6D.....	
Rev-pr7D.....T...KS.....K.....	
Rev-pi1D.....L.....	
Rev-pi2DE.....G...L.....G.....	
Rev-pi3D.....L.....	
Rev-pi4DR.....L.....Q	
Rev-pi5	..H.....DE.....G...L.....G.....	
Rev-pi6D.....L.....	
Rev-pi7D.....L.....	

Tat236/D.....L.....
Rev

150

Rev-ob RLSGLDRRIQQLEDLVRHMSLGSPDPSTPSASVLSVNPPAQTPLGHLPPR
Rev-na
Rev-pr1
Rev-pr2
Rev-pr3
Rev-pr4
Rev-pr5
Rev-pr6
Rev-pr7K.....

Rev-pi1
Rev-pi2
Rev-pi3
Rev-pi4R.....
Rev-pi5
Rev-pi6
Rev-pi7
Tat236/KE.....
Rev

186

Rev-ob SYFKLKRVDGAGWDLRRTAAPGLPICELDWIQGTK
Rev-na
Rev-pr1
Rev-pr2
Rev-pr3
Rev-pr4
Rev-pr5
Rev-pr6
Rev-pr7E.....
Rev-pi1.....
Rev-pi2.....
Rev-pi3.....
Rev-pi4.....
Rev-pi5.....
Rev-pi6.....
Rev-pi7.....
Tat236/.....
Rev

BIBLIOGRAPHIE

- ABED Y, ST-LAURENT G, ZHANG H, JACOBS RM, et ARCHAMBAULT D. 1999. Development of a Western blot assay for detection of bovine immunodeficiency-like virus using capsid and transmembrane envelope proteins expressed from recombinant baculovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**: 168-172
- ABED Y, et ARCHAMBAULT D. 2000. A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection. *J Virol Methods* **85**: 109-116
- AGNARSDOTTIR G, THORSTEINSDOTTIR H, OSKARSSON T, MATTHIASDOTTIR S, ST HAFLIDADOTTIR B, ANDRESSON OS, et ANDRESDOTTIR V. 2000. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* **81**: 1901-1905
- ALBRECHT TR, LUND LH, et GARCIA-BLANCO MA. 2000. Canine cyclin T1 rescues equine infectious anemia virus Tat *trans*-activation in human cell. *Virology* **2**: 7-11
- ALDROVANDI GM, GAO L, BRISTOL G, et ZACK JA. 1998. Regions of human immunodeficiency virus type 1 nef required for function *in vivo*. *J Virol* **72**: 7032-7039
- ALKHATIB G, COMBADIÈRE C, BRODER, CC FENG, Y, KENNEDY PE, MURPHY P, et BERGER EA. 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP1- α , MIP1- β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**: 1955-1958
- ARCHAMBAULT D, WANG ZN, LACAL JC, GAZIT A, YANIK D, DAHLBERG JE, et TRONICK SR. 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anemia virus detection using recombinant Pr55 gag. *J Clin Microbiol* **27**: 1167-1173
- ARCHAMBAULT D, ST-LOUIS MC, et MARTIN S. 2005. Binding of Cellular Proteins to the Leader RNA of Equine Arteritis. *Virus Genes* **30**: 121-125
- ARRIGO SJ, et CHEN IS. 1991. Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev* **5**: 808-819

- BACCAM P, THOMPSON RJ, LI Y, SPARKDS WO, BELSCHAN M, DORMAN KS, WANNEMUEHLER Y, OAKS J, CORNETTE L, et CARPENTER S. 2003. Subpopulations of Equine Infectious Anemia Virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype. *J Virol* **77**: 12122-12131
- BARBORIC M, TAUBE R, NEKREP N, FUJINAGA K, et PETERLIN BM. 2000. Binding of Tat to TAR and recruitment of positive transcription elongation factor b occur independently in bovine immunodeficiency virus. *J Virol* **74**: 6039-6044
- BARON T, MALLET F, POLACK B, BANDEMPS D, et BELLI P. 1995. The bovine immunodeficiency-like virus (BIV) is transcriptionally active in experimentally infected calves. *Arch Virol* **40**: 1461-1467
- BASSUK AG, ANANDAPPA RT, et LEIDEN JM. 1997. Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J Virol* **71**: 3563-3673
- BELSHAN M, HARRIS ME, SHOEMAKER AE, HOPE TJ, et CARPENTER S. 1998. Biological characterization of Rev variation in equine infectious anemia virus. *J Virol* **72**: 4421-4426
- BELSHAN M, BACCAM P, OAKS JL, SPONSELLER BA MURPHY SC, CORNETTE J, et CARPENTER S. 2001. Genetic and biological variation in equine infectious anemia virus Rev correlates with variable stages of clinical disease in an experimentally infected pony. *Virology* **279**: 185-200
- BENKO DM, ROBINSON R, SOLOMIN L, MELLINI M, FELBER BK, et PAVLAKIS GN. 1990. Binding of trans-dominant mutant Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 to the cis-acting Rev-responsive element does not affect the fate of viral mRNA. *New Biol* **7**: 1111-1122
- BIENIASZ PD, GRDINA TA, BOGERD HP, et CULLEN BR. 1998 Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J* **17**: 7056-7065
- BLACKLAWS BA, BIRD P, ALLEN D, ROY DJ, MACLENNAN IC, HOPKINS J, SARGAN DR, et MCCONNELL. 1995. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. *J Virol* **69**: 1400-1407
- BOGERD HP, WIEGAND HL, YANG J, et CULLEN BR. 2000. Mutational definition of functional domains within the Rev homolog encoded by human endogenous retrovirus K. *J Virol* **74**: 9353-9361

- BORMAN AM, QUILLET C, CHARNEAU P, DAUGUET C, et CLAVEL F. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol* **69**: 2058-2067
- BOUILLANT AM, RUCKERBAUER M, et NIELSEN KH. 1989. Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections *in vitro*. *Res Virol* **140**: 511-529
- BOYER PL, FERRIS AL, et HUGHES SH. 1992. Mutational analysis of the fingers domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **66**: 7533-7537
- BRICE PC, KELLEY AC, et BUTLER PJ. 1999. Sensitive *in vitro* analysis of HIV-1 Rev multimerization. *Nucleic Acids Res* **27**: 2080-2085
- BURKALA EJ, ELLIS TM, VOIGT V, et WILCOX GE. 1999. Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. *Vet Microbiol* **68**: 171-177
- CAREY M, et SMALE, ST. 2000. Transcription regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- CARPENTER S, MILLER LD, ALEXANDERSEN S, WHETSTONE CA, VAN DER MAATEN MJ, VIUFF B, WANNEMUEHLER Y, MILLER JM, et ROTH JA. 1992. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol* **66**: 1074-1083
- CARPENTER S, NADIN-DAVIS SA, WANNEMUEHLER Y, et ROTH JA. 1993. Identification of transactivation-response sequences in the long terminal repeat of bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol* **67**: 4399-4403
- CARPENTER CC, FISCHL MA, HAMMER SM, HIRSCH MS, JACOBSEN DM, KATZENSTEIN DA, MONTANER JS, RICHMANN DD, SAAG MS, SCHOOLEY RT, THOMPSON MA, YELLA S, YENI PG, et VOLBERDING PA. 1997. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* **277**: 1962-1969
- CARPENTER S, VAUGHN EM, YANG J, BACCAMP P, ROTH JA, et WANNEMUEHLER Y. 2000. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with BIV (R29) isolate. *J Gen Virol* **81**: 1463-1472

- CAVIRANI S, DONOFRIO G, CHIOCCO D, FONI E, MARTELLI P, ALLEGRI G, CABASSI CS, DE IACO B, et FLAMMINI CF. 1998. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev Vet Med* **37**: 147-157
- CHADWICK BJ, COELEN RJ, WILCOX GE, SAMMELS LM, et KERTAYADNYA G. 1995. Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *J Gen Virol* **76**: 1637-1650
- CHATTERJI U, DE PARSEVAL A, et ELDER JE. 2002. Feline Immunodeficiency Virus OrfA. is distinct from other lentivirus transactivators. *J Virol* **76**: 9624-9634
- CHEN D, FONG Y, et ZHOU Q. 1999. Specific interaction of Tat with the human but not rodent P-TEFb complex mediates the species-specific Tat activation of HIV-1 transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2728-2733
- CHEN L, et FRANKEL AD. 1995. A peptide interaction in the major groove of RNA resembles protein interactions in the minor groove of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5077-5081
- CHEN SS, FERRANTE AA, et TERWILLIGER EF. 1996. Characterization of an envelope mutant of HIV-1 that interferes with viral infectivity. *Virology* **226**: 260-268
- CHENG SM, BLUME M, LEE SG, HUNG PP, HISCH VM, et JOHNSON PR. 1990. Biotechnology and Microbiology Division, Wyeth-Ayerst Research, Radnor. *J Med Primatol* **19**: 167-176
- CHIRMULE N, et PAHWA S. 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev* **60**: 386-406
- CLEMENTS JE et ZINK MC. 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev* **9**: 100-117
- COCKERELL GL, JENSEN WA, ROVNAK J, ENNIS WH, et GONDA MA. 1992. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd. *Vet Microbiol* **31**: 109-116
- COOPER C, HANSON LA, DIEHL WJ, PHARR GT, et COATS KS. 1999. Natural selection of the *pol* gene of Bovine Immunodeficiency Virus. *Virology* **255**: 294-301

- CULLEN BR. 1998. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**: 203-210
- DEMART S, CECCHERINI-SILBERSTEIN F, SCHLICHT S, WALCHER S, WOLFF H, NEUMANN M, ERFE V et BRACK-WERNER R. 2003. Analysis of nuclear targeting activities of transport signal in the human immunodeficiency virus Rev protein. *Exp Cell Research* **291**: 484-501
- DENG L, DE LA FUENTE C, FU P, WANG L, DONNELLY R, WADE JD, LAMBERT P, LI H, LEE CG et KASHANCHI F. 2000. Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* **277**: 278-295
- DOMINGO E, MARTIN V, PERALES C, GRANDE-PEREZ J, et ARIAS A. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 51-82
- EDINGER, AL, AMEDEE A, MILLER K, DORANZ BJ, ENDRES M, SHARRON M, SAMSON M, LU ZH, CLEMENTS JE, MURPHET-CORB M, PEIPER SC, PARMENTIER M, BRODER CC, et DOMS RW 1997. Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4005-4010
- FENG S, et HOLLAND EC. 1988. HIV-1 Tat *trans*-activation requires the loop sequence within Tar. *Nature* **334**: 165-167
- FONG SE, PALLANSCH LA, MIKOVITS JA, LACKMAN-SMITH CS, RUSCETTI FW, et GONDA MA. 1995. *Cis*-acting regulatory elements in the bovine immunodeficiency virus long terminal repeat. *Virology* **209**: 604-614
- FONG SE, GREENWOOD JD, WILLIAMSON JC, DERSE D, PALLANSCH LA, COPELAND T, RASMUSSEN L, MENTZER A, NAGASHIMA K, TOBIN G, et GONDA MA. 1997. Bovine immunodeficiency virus tat gene: cloning of two distinct cDNAs and identification, characterization, and immunolocalization of the tat gene products. *Virology* **233**: 339-335
- FONG SK, et CHAN HC. 1998. Regulation of anion secretion by prostaglandin E2 in the mouse endometrial epithelium. *Biol Reprod* **58**: 1020-1025
- FOUCHIER RA, GROENINK M, KOOTSTRA NA, TERSMETTE M, HUISMANN HG, MIEDEMA F et SCHUITEMAKER H. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* **66**: 3183-3187

- GALDERISI U, CIPOLLARO M, et GIORDANO A. 2006. The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology. *Oncogene* **25**: 5250-5256
- GARBER ME, MAYALL TP, SUESS EM, MEISENHELDER J, THOMPSON NE, et JONES KA. 2000. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol Cell Biol* **20**: 6958-6969
- GARBER MP, KEWALRAMANI WP, MAYALL TP, HERRMANN CH, RICE AP, LITTMAN DR, et JONES KA. 1998. The interaction between HIV-1 *Tat* and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine *CycT1* protein. *Genes Dev* **112**: 3512-3527
- GAROFF H, HEWSON R et OPSTELTEN DJ. 1998. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1171-1190
- GARVEY KJ, OBERSTE MS, ELSER JE, BRAUN MJ, et GONDA MA. 1990. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* **175**: 391-409
- GDOVIN SL, et CLEMENTS JE. 1992. Molecular mechanisms of visna virus *Tat*: Identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post-transcriptional effect. *Virology* **188**: 438-450
- GOLDSTEIN G. 1996. HIV-1 *Tat* protein as a potential AIDS vaccine. *Nat Med* **2**: 960-964
- GOLUB EI, LI GG, et VOLSKY DJ. 1990. Differences in the basal activity of the long terminal repeat determine different replicative capacities of two closely related human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **64**: 3654-3660
- GONDA MA, BRAUN MJ, CARTER SG, KOST TA, BESS JW, ARTHUR LO, et VAN DER MAATEN MJ. 1987. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to the human immunodeficiency virus. *Nature* **330**: 388-391
- GONDA MA, OBERSTE MS, GARVEY KJ, PALLANSCH LA, BATTLES JK, PIFAT DY, BESS JR JW, et NAGASHIMA K. 1990. Development of the bovine immunodeficiency-like virus as a model of lentivirus disease. *Dev Biol Stand* **72**: 97-110
- GONDA MA 1992. Bovine immunodeficiency virus. *AIDS* **6**: 759-776
- GONDA MA. 1994. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Ann NY Acad Sci* **724**: 22-42

- GORBALENYA AE, ENJUANES L, ZIEBUHR ET, et SNIJDER EJ. 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* **117**: 17-37
- GORLICH D, KOSTKA S, DINGWALL C, LASKEY RA, HARTMANN E, et PREHN S. 1995. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* **5**: 383-392
- GOUGEON ML, ROUZIOUX C, LIBERMAN I, BURGARD M, TAOUFIK Y, VIARD JP, BOUCHENAFI K, CAPITANT C, DELFRAISSY JF, et LEVY Y. 2001. Immunological and virological effects of long term IL-2 therapy in HIV-1-infected patients. *AIDS* **15**: 1729-1731
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95-98
- HEINEMEYER T, WINGENDER E, HERMIAKOB H, KEL AE, KEL OV, IGNATIEVA EV, ANANKO EA, PODKOLODNAYA OA, KOLPAKOV FA, PODKOLODNY NL, et KOLCHANOV NA. 1998. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**: 362-367
- HEINZINGER NK, BUKINSKY MI, HAGGERTY SA, RAGLAND AM, KEWALRAMANI V, LEE MA, GENDELMAN HE, RATNER L, STEVENSON M, et EMERMAN M. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7311-7315
- HINDMARSH P, et LEIS J. 1999. Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 836-843
- HIRAI N, KABEYA H, OHASHI K, SUGIMOTO C, et ONUMA M. 1996. Detection of antibodies against bovine immunodeficiency-like virus in daily cattle in Hokkaido. *J Vet Med Sci* **58**: 455-457
- HOFFMANN TL, STEPHENS EB, NARAYAN O, et DOMS RW. 1998. HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11360-11365
- HSIOU Y, DING J, DAS K, CLARK AD JR, BOYER PL, LEWIS P, JANSSEN PA, KLEIM JP, ROSNER M, HUGHES SH, et ARNOLD E. 2001. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol* **309**: 437-445

- ISHIDA T, HAMANO A, KOIWA T, et WATANABE T. 2006. 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals *Retrovirology* **3**: 69-70
- JACOBS RM, SMITH HE, WHETSTONE CA, SUAREZ DL, JEFFERSON B, et VALLI VE. 1994. Haematological and lymphocyte subset analyses in sheep inoculated with bovine immunodeficiency-like virus. *Vet Res Commun* **18**: 471-482
- JACOBS RM, POLLARI FL, MCNAB WB, et JEFFERSON B. 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res* **59**: 271-278
- JEANG KT, XIAO H, et RICH EA. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* **274**: 28837-28840
- JEONG EJ, HWANG GS, KIM KH, KIM MJ, KIM S, et KIM KS. 2000 Structural analysis of multifunctional peptide motifs in human bifunctional tRNA synthetase: identification of RNA-binding residues and functional implications for tandem repeats. *Biochemistry* **39**: 15775-15782
- KALVATCHEV Z, WALDER R, PEREZ F, GARZARO D, et BARRIOS M. 1998. Infection of rabbits with R29 strain of bovine immunodeficiency virus: virulence, immunosuppression, and progressive mesenteric lymphadenopathy. *Viral Immunol* **11**: 159-166
- KALVATCHEV Z, WALDER R, GARZARO D, et BARRIOS M. 2000. Detection of genetic diversity among bovine immunodeficiency virus population by single-strand conformation polymorphism analysis. *Viral Immunol* **13**: 373-381
- KAO S, KHAN MA, MIYAGI E, PLISHKA R, BUCKLER-WHITE A, et STREBEL K. 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**: 11398-11407
- KARN J. 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**: 235-254
- KASHANCHI F, LIU ZQ, ATKINSON B, et WOOD C. 1991. Comparative evaluation of bovine immunodeficiency-like virus infection by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **31**: 197-209

- KASHANCHI F, AGBOTTAH ET, PISE-MASISON CA, MAHIEUX R, DUVALL J, KUMAR A, et BRADY JN. 2000. Cell cycle-regulated transcription by the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator. *J Virol* **74**: 652-660
- KAUR A, ALEXANDER L, STAPRANS SI, DENEKAMP L, HALE CL, MC CLURE HM, FEINBERG MB, DESROSIERS RC, et JOHNSON RP. 2001. Emergence of cytotoxic T lymphocyte escape mutations in nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* **31**: 3207-3217
- KAWAI Y, ASAI K, MIURA Y, INOUE Y, YAMAMOTO M, MORIYAMA A, YAMAMOTO N, et KATO T. 2003. Structure and promoter activity of the human glia maturation factor-gamma gene: a TATA-less, GC-rich and bidirectional promoter. *Biochim. Biophys Acta* **3**: 3246-3252
- KEMPSTER S, COLLINS ME, et BROWNLIE J. 2002. Tat protein expression in MDBK cells does not confer susceptibility to bovine immunodeficiency virus. *Arch Virol* **147**: 643-649
- KIERNAN RE, VANHULLE C, SCHILTZ L, ADAM E, XIAO H, MAUDOUX F, CALOMME C, BURNY A, NAKATANI Y, JEANG KT, BENKIRANE M, et VAN LINT C. 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* **18**: 6106-6118
- KOBAYASHI M et KAWAKAMI K. 1997. Synergism of the ATF/CRE site and GC box in the housekeeping Na,K-ATPase alpha1 subunit gene is essential for constitutive expression. *Biochem Biophys Res Commun* **241**: 169-174
- KOPP JL, WILDER PJ, DESLER M, KIM JH, HOU J, NOWLING T, et RIZZINO A. 2004. Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3, and PU.1, on the promoter of the type II transforming growth factor-beta receptor gene. *J Biol Chem* **279**: 19407-19420
- KREBS FC, MEHRENS D, POMEROY S, GOODENOW MM, et WIGDAHL B. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat quasispecies differ in basal transcription and nuclear factor recruitment in human glial cells and lymphocytes *J Biomed Sci* **1**: 31-44
- KREBS FC, ROSS HL, NONNEMACHER MR, HOGAN TH, QUITERO SJ, HENDERSON A, MCALLISTER JJ, et WIGDAHL B. 2001. Interaction between CCAAT/enhancer binding protein and cyclic AMP response element binding protein 1 regulates human immunodeficiency virus type 1 transcription in cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Virol* **75**: 1842-1856

- KREBS FC, HOGAN TH, QUITERIO S, GARTNER S, et WIGDAHL B. 2002. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. *HIV Sequence* **3**: 44-59
- KUIKEN CL, FOLEY B, HAHN B, KORBER B, MCCUTCHAN F, MARX PA, MELLORS JW, SODROSKI J, et WOLINSKY S. 2001. *Compendium 2 Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Lab* **10**: 1-42
- KUTOH E, MARGOT JB, et SCHWANDER J. 1999. Identification and characterization of the putative retinoblastoma control element of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Cancer Lett* **136**: 187-194
- LEE JH, MURPHY N, BELSHAN M, SPARKS Y, WANNEMUEHLER S, LIU TJ, HOPE S, DOBBS D, et CARPENTER S. 2006. Characterization of functional domains of equine infectious anemia virus Rev suggests a bipartite RNA-binding domain. *J. Virol* **80**: 3844-3852
- LIU H, WU X, XIAO H, et KAPPES JC. 1999. Targeting human Immunodeficiency virus (HIV) type 2 integrase protein into HIV type 1. *J Virol* **73**: 8831-8836
- LIU ZQ, SHERIDAN D, et WOOD C. 1992. Identification and characterization of the bovine immunodeficiency-like virus tat gene. *J Virol* **66**: 5137-5140
- MAK J, et KLEIMAN L. 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* **71**: 8087-8095
- MALMQUIST WA, VAN DER MAATEN MJ, et BOOTHE AD. 1969. Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res* **29**: 188-200
- MANSKY LM. 1998. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol* **79**: 1337-1345
- MARTINS LP, CHENCINER N, ASJO B, MEYERHANS D, et WAIN-HOBSON S. 1991. Independent fluctuation of human immunodeficiency virus type 1 rev and gp41 quasispecies *in vivo*. *J Virol* **65**: 4502-4507
- MAURY WR, THOMPSON J, JONES Q, BRADLEY S, DENKE T, BACCAM P, SMAZIK M et OAKS JL. 2005. Evolution of the equine infectious anemia virus long terminal repeat during the alteration of cell tropism. *J. Virol* **79**: 5653-5664

- MCNAB WB, JACOBS RM, et SMITH HE. 1994. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and association between test results, production records and management practices. *Can J Vet Res* **58**: 36-41
- MEAS S, KABEYA H, YOSHIHARA S, OHASHI K, MATSUKI S, MIKAMI Y, SUGIMOTO C, et ONUMA M. 1998. Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci* **60**: 1195-1202
- MEAS S, OHASHI K, TUM S, CHHIN M, TE K, MIURA K, SUGIMOTO C, et ONUMA M. 2000. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci* **62**: 779-781
- MEAS S, OHASHI K, SUGIMOTO C, et ONUMA M 2001. Phylogenetic relationships of bovine immunodeficiency virus in cattle and buffaloes based on surface envelope gene sequences. *Arch Virol* **146**: 1037-1045
- MIKAELIAN I, KRIEG M, et KARN J. 1996. Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J Mol Biol* **257**: 246-264
- MILICH L, MARGOLIN B, et SWANSTROM R. 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* **67**: 5623-5634
- MOLINA RP, MATUKONIS M, PASZKIET B, ZHANG J, KALEKO M, et LUO T. 2002. Mapping of the bovine immunodeficiency virus packaging signal and RRE and incorporation into a minimal gene transfer vector. *Virology* **304**: 10-23
- MULUNEH A. 1994. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. *Zentralbl Veterinarmed B* **41**: 679-684
- NADIN-DAVIS SA, CHANG SC, ROTH JA, et CARPENTER S. 1993. Isolation and characterization of cDNAs encoding rev and tat of bovine immunodeficiency-like virus. GenBank numéro L06504
- NAGASHUNMUGAM T, VELPANDI A, GOLDSMITH CS, ZAKI SR, KALYANARAMAN VS, et SRINIVASAN A. 1992. Mutation in the primer binding site of the type 1 human immunodeficiency virus genome affects virus production and infectivity *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4114-4118

- NÁJERA S, HOLGUÍN I, QUIÑONES-MATEU A, ME MUÑOZ-FERNÁNDEZ MA, NÁJERA A, LÓPEZ-GALÍNDEZ C, et DOMINGO E. 1995. *Pol* gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *Virology* **69**: 23-31
- NARAYAN O et CLEMENTS JE. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* **70**: 1617-1639
- NONNEMACHER MR, IRISH BP, LIU Y, MANGER D, et WIGDAHL B. 2004. Specific sequence configurations of HIV-1 LTR G/C box array result in altered recruitment of Sp isoforms and correlate with disease progression. *J Neuroimmunol* **157**: 39-47
- OBERSTE MS, GREENWOOD JD, et GONDA MA. 1991. Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative rev and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol* **65**: 3932-3937
- OBERSTE MS, WILLIAMSON JC, GREENWOOD JD, NAGASHIMA K, COPELAND TD, et GONDA MA. 1993. Characterization of bovine immunodeficiency virus rev cDNAs and identification and subcellular localization of the Rev protein. *J Virol* **67**: 6395-6405
- OLSEN HS, COCHRANE AW, DILLON PJ, NALIN CM, et ROSEN CA. 1990. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev* **4**: 1357-1364
- ONUMA M, KOOMOTO E, FURUYAMA H, YASUTOMI Y, TANIYAMA H, IWAI H, et KAWAKAMI Y. 1992. Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* **5**: 1009-1015
- OTT M, SCHNOLZER M, GARNICA J, FISCHLE W, EMILIANI S, RACKWITZ HR, et VERDIN E. 1999. Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* **9**: 1489-1492
- PASTORCIC M, et DAS HK. 1999. An upstream element containing an ETS binding site is crucial for transcription of the human presenilin-1 gene. *J Biol Chem* **274**: 24297-24307

- PELOPONESE JM jr, COLLETTE Y, GREGOIRE C, BAILLY C, CAMPESE D, MEURS EF, OLIVE D, et LORET EP. 1999. Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and another continents. *J Biol Chem* **274**: 11473-11478
- PIENIAZEK D, RAYFIELD M, HU DJ, NKENGASONG J, WIKTOR SZ, DOWNING R, BIRYAHWAHO B, MASTRO T, TANURI A, SORIANO V, LAL R, et DONDERO T. 2000. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. *HIV Variant Working Group AIDS* **14**: 1489-1495
- PIFAT DY, ENNIS WH, WARD JM, OBERSTE MS, et GONDA MA. 1992. Persistent infection of rabbits with bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol* **66**: 4518-4524
- PING YH, et RANA TM. 1999. Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes. *J Biol Chem* **274**: 7399-7404
- POLACK B, SCHWARTZ I, BERTHELEMY M, BELLOC C, MANET G, VUILLAUME A, BARON T, GONDA MA, et LEVY D. 1996. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Vet Microbiol* **48**: 165-173
- PUGLISI JD, CHEN L, BLANCHARD S, et FRANKEL AD. 1995. Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex. *Science* **270**: 1200-1203
- RANA TM, et JEANG KT. 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* **365**: 175-185
- RUBIO A, LEAL M, PINEDA JA, CARUZ A, LUQUE F, REY C, SANCHEZ-QUIJANO A, et LISSEN E. 1997. Increase in the frequency of mutation at codon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1-infected antiviral-naive patients from 1989 to 1996. *AIDS* **11**: 1184-1186
- SALFERD J, GOTTLINGER HG, SIA RA, PARK RE, SODROSKI JG, et HASELTINE WA. 1990. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J* **9**: 965-970
- SALTARELLI MJ, SCHOBORG R, GDOVIN SL, et CLEMENTS JE. 1993. The CAEV Tat Gene *trans*-activates the viral LTR and is necessary for efficient viral replication. *Virology* **197**: 35-44

- SAMBROOK J, FRITSCH EF, et MANIATIS T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2ème edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SCHOBORG RV, et CLEMENTS JE. 1996. Definition of the RRE binding and activation domains of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein. *Virology* **226**: 113-121
- SCHWARZENBACH H, NEWELL JW, et MATTHIAS P. 1995. Involvement of the Ets family factor PU.1 in the activation of immunoglobulin promoters. *J Biol Chem* **270**: 898-907
- SCOBIE L, VENABLES C, SAYERS AR, WEIGHTMAN S, et JARRETT O. 2001. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Vet Rec* **149**: 459-460
- SIMON, JH, FOUCHIER RA, SOUTHERLING TE, GUERRA CB, GRANT CG, et MALIM MA. 1997. The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *J Virol* **71**: 5259-5267
- SOMMERFELT MA. 1999. Retrovirus receptors. *J Gen Virol* **80**: 3049-3064
- SOUTHGATE CD, et GREEN MR. 1995. Delineating minimal protein domains and promoter elements for transcriptional activation by lentivirus Tat proteins. *J Virol* **69**: 2605-2610
- ST-CYR COATS K, PRUANDT SB, NASH JW, et COOPER CR. 1994. Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. *Vet Microbiol* **42**: 181-189
- ST-LOUIS MC, COJOCARIU M, et ARCHAMBAULT D. 2004. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Anim Health Res Rev* **5**: 125-143
- ST-LOUIS MC, ABED Y, et ARCHAMBAULT D. 2005. The bovine immunodeficiency virus: cloning of a tat/rev cDNA encoding a novel Tat protein with enhanced transactivation activity *Arch Virol* **150**: 1529-1547
- STRACK B, CALISTRI A, et GOTTLINGER HG. 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol* **76**: 5472-5479
- SUAREZ DL, VAN DER MAATEN MJ, WOOD C, et WHETSTONE CA. 1993. Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *J Virol* **67**: 5051-5055

- SUAREZ DL, et WHETSTONE CA. 1995. Identification of hypervariable and conserved regions in the surface envelope gene in the bovine lentivirus. *Virology* **212**: 728-733
- SUAREZ DL, VAN DER MAATEN MJ, et WHETSTONE CA. 1995. Improved early and long-term detection of bovine lentivirus by a nested polymerase chain reaction test in experimentally infected calves. *Am J Vet Res* **56**: 579-586
- SUAREZ DL, et WHETSTONE CA. 1997. Size variation within the second hypervariable region of the surface envelope gene of the bovine lentivirus BIV in experimentally and naturally infected cattle. *J Virol* **71**: 2482-2486
- TAUBE R, FUJINAGA K, WIMMER J, BARBORIC M, et PETERLIN M. 1999. Tat transactivation: A model for the regulation of eucaryotic transcriptional elongation. *Virology* **264**: 245-253
- TAUBE R, FUJINAGA K, IRWIN D, WIMMER J, GEYER M, et PETERLIN BM. 2000. Interactions between equine cyclin T1, Tat, and TAR are disrupted by a leucine-to-valine substitution found in human cyclin T1. *Mol Cell Biol* **74**: 892-898
- TILEY LS, BROWN PH, LE SY, MAIZEL JV, CLEMENTS JE, et CULLEN BR. 1990. Visna virus encodes a post-transcriptional regulator of viral structural gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7497-7501
- TILEY LS, MALIM MH, et CULLEN BR. 1991. Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and visna virus Rev proteins. *J Virol* **65**: 3877-3881
- TILEY LS, et CULLEN BR 1992. Structural and functional analysis of the *visna virus* Rev-response element. *J Virol* **66**: 3609-3615
- TILEY LS, MALIM MH, et CULLEN. BR 1992. Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and *visna virus* Rev proteins. *J Virol* **65**: 3877-3881
- TRUYEN U, PARRISH CR, HARDER TC, et KAADEN OR. 1995. There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. *Vet Microbiol* **43**: 103-122
- VAN DER MAATEN MJ, et WETSTONE CA. 1992. Infection of rabbits with bovine immunodeficiency-like virus. *Vet Microbiol* **30**: 125-135

- VERGNE L, PEETERS M, MPOUDI-NGOLE E, BOURGEOIS A, LIEGEOIS F, TOURE-KANE C, MBOUP S, MULANGA-KABEYA C, SAMAN E, JOURDAN J, REYNES J, et DELAPORTE E. 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol* **38**: 3919-3925
- WALDER R, KALVATCHEV Z, TOBIN GJ, BARRIOS MN, GARZARO DJ, et GONDA MA. 1995. Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. *Res Virol* **46**: 313-323
- WHESTONE CA, VAN DER MAATEN MJ, et MILLER JM. 1991. A western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimentally inoculated cattle, sheep, and goats. *Arch Virol* **116**: 119-131
- WHETSTONE CA, SAYRE KR, DOCK NL VANDERMAATEN MJ, MILLER JM, LILLEHOJ E, et ALEXANDER SS. 1992. Examination of whether persistently indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western immunoblot reactions are due to serological reactivity with bovine immunodeficiency-like virus. *J Clin Microbiol* **30**: 764-770
- WRIGHT SM, MLECZKO A, et COATS KS. 2002. Bovine Immunodeficiency Virus Expression *in vitro* is reduced in the presence of chemokines, MIP-1 alpha, MIP-1-beta and RANTES. *Vet Res Commun* **26**: 239-250
- ZAPP ML, HOPE TJ, PARSLOW TG, et GREEN MR 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7734-7738
- ZHANG MJ, et DAYTON AI. 1998. Tolerance of diverse amino acid substitutions at conserved positions in the nuclear export signal (NES) of HIV-1 Rev. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 113-116