

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DU DOMAINE DE
MULTIMÉRISATION DE LA PROTÉINE REV
DU VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE BOVINE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
CLAUDE MARCHAND

JANVIER 2015

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

J'aimerais remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, le Dr Denis Archambault pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire et pour m'avoir encouragée à continuer à faire de la recherche. Je le remercie aussi pour son soutien intellectuel et financier ainsi que pour son amitié.

Je désire aussi remercier les techniciens de l'UQAM pour leur dévouement et tous les services rendus. Un merci particulier à Luc Dubé pour son aide et à Denis Flipo pour les heures passées au microscope.

Je remercie tous les gens de mon entourage qui ont cru en moi et qui m'ont encouragé dans mes études.

Merci à mon copain qui m'a soutenue du début à la fin, qui m'a redonné le courage quand je l'avais perdu et le sourire dans les périodes plus difficiles.

Finalement, merci à la Fondation UQAM qui m'a remis différentes bourses pour souligner mes efforts et mon engagement dans la communauté de l'UQAM. Cette aide financière a été grandement appréciée.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES SYMBOLES	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE VIB	4
1.1 Les rétrovirus.....	4
1.2 Les lentivirus	5
1.3 Le virus de l'immunodéficience bovine	7
1.3.1. Historique.....	7
1.3.2. Distribution.....	7
1.3.3. Pathologies	8
1.3.4. Mode de transmission.....	9
1.3.5. Tropisme	10
1.3.6. Organisation structurale et génomique du VIB.....	11
1.4. Cycle de réplication virale	14
1.5. Les protéines accessoires.....	16
1.6. La protéine Rev	18
1.6.1. Les différents rôles de la protéine Rev.....	18
1.6.2. Multimérisation de Rev et liaison au RRE	21
1.6.3. Domaines fonctionnels.....	24
1.6.4. Caractéristiques uniques de la protéine Rev du VIB.....	26
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
2.1 Cellules et milieu de culture.....	28
2.2 Obtention des mutants de délétion	28
2.3 Construction des plasmides	31

2.4 Production des protéines Rev dans un système bactérien	33
2.5 Purification des protéines	34
2.6 Essai de multimérisation <i>in vitro</i>	35
2.6.1 Dosage protéique	35
2.6.2 Essai avec le glutaraldéhyde	35
2.6.3 Immunobuvardage de type Western Blot.....	36
2.7 Essai de multimérisation en culture cellulaire.....	37
2.7.1 Transfection.....	37
2.7.2 Immunofluorescence	37
2.7.3 Fluorescence par complémentation	38
2.7.4 Analyse des résultats	38
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	40
3.1 Production et purification de la protéine Rev	40
3.2 Vérification de la purification des protéines	43
3.3 Essai de multimérisation <i>in vitro</i>	43
3.4 Immunofluorescence.....	44
3.5 Essai de multimérisation en culture cellulaire par la technique du BiFC.....	45
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	51
Multimérisation <i>in vitro</i> avec GA	51
Multimérisation et BiFC	52
Avantages de la technique du BiFC	55
Organisation des domaines fonctionnels et perspectives	58
CONCLUSION.....	60
ANNEXE A	
Préparation de la matrice de terre de diatomée pour la mini extraction d'ADN.....	61
ANNEXE B	
Résultats préliminaires montrant que la protéine Rev peut former des dimères dans les cellules.....	62
APPENDICE A	
Description des plamides.....	63
APPENDICE B	

Séquence Rev BIV et ses domaines fonctionnels (Genbank : L04973.1).....	65
APPENDICE C	
Modèle d'assemblage de Rev sur le RRE.....	66
LISTE DE RÉFÉRENCES	67

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Organisation structurale du virus de l'immunodéficience bovine.....	12
1.2 Organisation génomique du virus de l'immunodéficience bovine en comparaison de celle du virus de l'immunodéficience humaine.	14
1.3 Le cycle de réplication des lentivirus.....	15
1.4 Rôle de la protéine Rev dans le transport des ARN viraux.....	21
1.5 Modèle d'assemblage de la protéine Rev du VIH-1 au niveau du RRE suggéré par Jain et Belasco.....	23
1.6 Structure tridimensionnelle de Rev.....	24
1.7 Domaines fonctionnels des protéines Rev et Rev-like des virus de la famille des <i>Retroviridae</i>	25
2.1 Mutants de délétion de la protéine Rev du VIB.....	29
2.2 Principe de la fluorescence par complémentation.....	38
3.1 Expression de la protéine Rev WT.....	41
3.2 Purification de la protéine Rev WT sur colonne Histidine.	42
3.3 Protéines Rev du VIB (WT à M9) et du VIH-1 (Rev230) purifiées.....	43
3.4 Essai de multimérisation <i>in vitro</i>	45
3.5 Efficacité de transfection des vecteurs de fluorescence par complémentation estimée par immunofluorescence.....	47
3.6 Localisation cellulaire de la protéine Rev du VIB par BiFC.....	48
3.7 Intensité de la fluorescence moyenne des protéines Rev suite au BiFC.....	50
4.1 Modèle d'interaction des mutants M1 et M5 de la protéine Rev du VIB sur le RRE.....	55
5.1 Multimérisation <i>in vivo</i> de la protéine Rev du VIB.....	62
5.2 Schématisation du vecteur pET-21b(+) utilisé pour produire la protéine Rev.	63
5.3 Schématisation des vecteurs de fluorescence par complémentation utilisés pour l'essai de multimérisation en culture cellulaire..	64

5.4 Séquence de la protéine Rev(souche R-29) du VIB et ses domaines fonctionnels connus.	65
5.5 Structure du RRE du VIH-1 et liaison de Rev.	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1. Amorces nucléotidiques employées pour le développement des clones de Rev dans le vecteur Pet21b(+)	30
2.2. Amorces nucléotidiques employées pour le développement des clones de Rev dans les vecteurs BiFC	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARM	Arginine rich motif
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation
BSA	Bovine serum albumin
CAEV	Caprine arthritis-encephalitis virus
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CMPS	Cellule mononucléée périphérique du sang
CRM1	<i>Chromosome region maintenance protein 1</i>
DDX1	DEAD box helicase 1
Env	Protéine de l'enveloppe virale
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
GA	Glutaraldéhyde
Gag	Groupe antigène
HEK	Human embryonic kidney cells
hRIP	Human Rev interacting protein
IN	Intégrase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

JDV	Jembrana disease virus
kDa	Kilo Dalton
LTR	Longues répétitions terminales
MVV	Maedi-Visna virus
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PKI	protéine kinase inhibitor
PR	Protéase
RBD	RNA binding domain
Rev	Régulateur de l'expression virale
RRE	Élément répondant à Rev (<i>Rev responsive element</i>)
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	Small interference RNA, petit ARN d'interférence
SU	Surface glycoprotein
TAR	Élément répondant à Tat
Tat	Transactivateur de la transcription
TI	Transcriptase inverse
TM	Transmembranaire

VAIE	Virus de l'anémie infectieuse équine
VIB	Virus de l'immunodéficience bovine
VIF	Virus de l'immunodéficience féline
Vif	Viral infectivity factor
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
WT	Wild-type

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
β	Bêta
$^{\circ}\text{C}$	Degrés Celsius
g	Gramme
x g	Gravité
h	Heure
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
M	Molaire
Mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
nt	Nucléotides
μg	Microgramme
μL	Microlitre
pb	Paire de base
%	Pourcentage
rpm	Révolution par minute
U	Unité

RÉSUMÉ

Précédemment, il a été montré chez le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) que la formation de multimères est essentielle pour que la protéine Rev puisse lier une structure secondaire des ARN viraux, l'élément de réponse à Rev ou RRE, et assurer leur transport du noyau vers le cytoplasme. Cette étape est très importante pour une réplication efficace du virus. Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) possède aussi une protéine Rev. Cette dernière n'a toutefois pas été caractérisée entièrement. Le présent projet voulait montrer que cette protéine peut former des multimères *in vitro* et *in vivo* comme cela a été démontré pour le VIH-1. Un deuxième objectif était de localiser la région impliquée dans la formation de multimères *in vitro*. Pour ce faire, des mutants de Rev ont été clonés dans le vecteur pET-21b(+) afin de produire les différentes protéines dans un système bactérien. Après purification, un essai au glutaraldéhyde a été effectué pour observer la formation de multimères. Les résultats préliminaires ont montré que le domaine de multimérisation serait de type bipartite et se localiserait entre les acides aminés 1 à 30 et 91 à 110. Les mutants Rev ont aussi été clonés dans des vecteurs de fluorescence par complémentation (BiFC), puis transfectés dans des cellules épithéliales rénales HEK 293T pour effectuer un test de fluorescence par complémentation. La localisation de la protéine Rev n'était pas affectée par la protéine de fluorescence et un signal vert a été détecté pour tous les mutants. Le test a donc été validé. Les résultats du test BiFC montrent une diminution significative de la dimérisation pour les mutants M1 (Δ 1-30) et M5 (Δ 91-110). Ces travaux pourront éventuellement servir de base pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés : VIB, multimérisation, BiFC, virus, protéine Rev

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience bovine fait partie de la famille des *Retroviridae*, genre *Lentivirus*. Les lentivirus sont reconnus pour induire des changements pathologiques chroniques et dégénératifs précédés d'une période d'incubation longue (Haase, 1986). Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) fait partie de ce groupe de virus. Comme les autres lentivirus, le génome du VIB possède plusieurs cadres de lecture ouverts ("Open Reading Frame") ou ORF codant pour des protéines accessoires dont quelques-unes jouent un rôle important dans la régulation de la réplication virale. Les deux principales protéines de régulation sont Tat ("Trans-Activator of Transcription") et Rev ("Regulator of Virion Expression"). Alors que Tat agit à titre d'activateur transcriptionnel, Rev régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en assurant le transport des transcrits viraux. En effet, la protéine Rev du VIB joue un rôle clé dans l'expression des gènes qui codent pour les protéines structurales. Cette dernière permet, en interagissant avec l'élément de réponse à Rev ("Rev Responsive Element" ou RRE), de faire passer les transcrits viraux d'ARN partiellement et non épissés du noyau vers le cytoplasme. Le RRE est une structure secondaire des ARN viraux (Oberste *et al.*, 1993).

Présentement, les chercheurs possèdent peu de connaissances sur les différents domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB. Ces domaines sont au nombre de trois. Le premier domaine est riche en résidus arginine et constitue le domaine de liaison à l'ARN ("RNA binding domain" ou RBD). Le second est le domaine de multimérisation et le dernier est un domaine riche en résidus leucine nécessaires pour l'exportation nucléaire de Rev via un signal d'exportation nucléaire ("Nuclear exportation signal" ou NES) (Daelemans *et al.*, 2004). À l'intérieur de ces domaines

se trouvent aussi les signaux de localisation nucléaire (" Nuclear Localisation Signal " ou NLS) et nucléolaire ("Nucleolar Localisation Signal" ou NoLS).

Il a été montré chez le VIH-1 que la formation de multimères est essentielle pour que Rev puisse lier le RRE et ainsi accomplir sa fonction d'exportation nucléaire (Daugherty *et al.*, 2010 a; Madore *et al.*, 1994). L'interaction de Rev avec d'autres protéines cellulaires serait aussi dépendante de la capacité de Rev à former des multimères comme c'est le cas avec le récepteur d'exportation nucléaire CRM1 ("Chromosome Region Maintenance 1", aussi appelée exportine 1) (Fornerod *et al.*, 1997). Pour s'y lier, Rev doit former le complexe Rev-RRE qui nécessite comme mentionné plus tôt la formation de multimères (Fernandes *et al.*, 2012). Si Rev ne peut accomplir sa fonction, les ARN viraux codant pour les protéines structurales ne peuvent être transportés au cytoplasme et ces dernières ne seront pas produites. Par conséquent, le virus ne pourra pas s'assembler et infecter les autres cellules. Rev est donc indispensable à la réplication du VIH-1, ce qui en fait une excellente cible dans la recherche de nouvelles thérapies antivirales. D'ailleurs, des chercheurs ont développé un "nanobody" dérivé de la chaîne lourde d'un anticorps qui a la capacité de bloquer l'assemblage des multimères de Rev et par conséquent d'inhiber la réplication du VIH-1 en culture cellulaire (Vercruysse *et al.*, 2010). Aussi, les études menées jusqu'à maintenant sur la caractérisation des domaines fonctionnels de Rev du VIB ont montré que cette dernière possède plusieurs caractéristiques qui la rendent unique parmi les protéines Rev et Rev-like des autres virus, ce qui en fait un excellent modèle d'étude chez les lentivirus (Gomez Corredor et Archambault, 2009 ; Gomez Corredor et Archambault, 2012).

Comme le VIB n'infecte que les bovins, il présente peu de risque pour l'homme. S'il s'avérait que le virus partage plusieurs traits communs avec le VIH-1, le VIB pourrait alors représenter un bon modèle d'étude. Cela limiterait ainsi les risques d'infection

et les coûts associés à la sécurité du personnel chercheur. Dans le cas où le VIB présenterait des différences majeures avec le VIH, l'étude en serait tout aussi importante afin de découvrir, peut-être, de nouvelles stratégies thérapeutiques qui seraient transposables au virus du SIDA. Ainsi, les deux virus seront étudiés en parallèle pour certaines étapes du projet de recherche. Cette étude s'intéresse à la localisation des domaines de multimérisation et à leur composition en acides aminés. La démarche adoptée consiste à montrer que la protéine Rev du VIB peut former des multimères avec deux technologies différentes, soit une première méthode *in vitro* avec un essai au glutaraldéhyde et une seconde méthode en culture cellulaire avec un essai de fluorescence par complémentation ("Bimolecular Fluorescence Complementation" ou BiFC). Pour ce faire, des mutants de délétion de la protéine Rev sauvage (WT) ont été générés par PCR-ligation-PCR et utilisés dans les deux tests mentionnés précédemment.

Ce document comporte quatre chapitres. Le premier chapitre présente une revue de la littérature concernant le virus de l'immunodéficience bovine allant de sa découverte jusqu'à son organisation génomique. La deuxième partie de ce chapitre traite plus en détails de la protéine Rev du VIB. Le matériel et la méthodologie utilisée sont présentés dans le chapitre II. Le chapitre III présente les résultats obtenus et le chapitre IV la discussion. Une conclusion suit ces chapitres et comporte les différentes avenues de recherches soulevées suite aux résultats de cette étude.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE VIB

1.1 Les rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive présentant 2 copies identiques. Leur capsid est enveloppée et de forme icosaédrique. Ils sont caractérisés par la présence d'une transcriptase inverse. La transcriptase inverse a pour rôle de copier l'ARN simple brin en ADN double brin pouvant alors s'insérer dans le génome de son hôte. Cette enzyme étant peu fidèle et le brin d'ARN étant monocaténaire, les erreurs lors de la transcription sont fréquentes. De ce fait, certains rétrovirus possèdent une grande variabilité génétique rendant difficile la prévention par la vaccination (Haase, 1986). Le virus intégré dans le génome de la cellule hôte (provirus) peut alors être répliqué en même temps que les autres gènes cellulaires. Plusieurs virus vont s'intégrer dans un type cellulaire donné seulement. Ces virus sont appelés rétrovirus exogènes. Au contraire, d'autres virus vont s'intégrer dans un oocyte, un spermatozoïde ou un précurseur des cellules germinales. À ce moment, le provirus s'intègre complètement dans le génome. Une fois que les cellules commencent à se diviser, le provirus intégré sera présent dans la totalité des cellules de l'organisme. Ces derniers sont appelés rétrovirus endogènes. Il n'existe pas de mécanisme pour éliminer le virus dans ce cas. Cependant, certaines parties du virus peuvent être éliminées par recombinaison, délétion, mutation ou présence d'un codon arrêt qui interrompt le cadre de lecture ce qui prévient l'expression de protéines virales fonctionnelles et de virus infectieux. Ces virus sont dits défectifs et ne peuvent se répliquer (Denner, 2010).

1.2 Les lentivirus

Les membres du genre *Lentivirus* appartiennent à la famille *Retroviridae*. Les lentivirus comprennent le VIH, le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), le virus de l'immunodéficience féline (VIF), le virus Maedi-Visna (MVV) chez le mouton, le virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE), le virus de l'encéphalite et de l'arthrite caprine ou "Caprine arthritis-encephalitis virus" (CAEV), le virus de la maladie de Jembrana ou "Jembrana disease virus" (JDV) chez le bétail en Indonésie et le VIB (Mahy, 2009; St-Louis *et al.*, 2004).

Les lentivirus ne sont pas oncogéniques. Ils sont plutôt reconnus pour induire des changements pathologiques chroniques et dégénératifs précédés d'une période d'incubation longue (Haase, 1986). Les changements pathologiques sont souvent associés au développement de lésions médiées par le système immunitaire. Tous les lentivirus infectent les macrophages et les monocytes. Le VIF, le VIS et le VIH infectent aussi les cellules T. Par conséquent, ils sont associés à des signes cliniques d'immunodéficience chez les hôtes infectés. De plus, les lentivirus, contrairement aux autres virus, peuvent se répliquer dans les cellules qui ne sont pas en division (Desrosiers, 2001). Le génome des lentivirus est une structure complexe comprenant différents gènes accessoires dont certains codent pour des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes viraux. Tous les lentivirus connus possèdent au moins trois gènes de plus que les gènes standards *gag*, *pol* et *env*. Ces gènes contribuent à une réplication virale plus complexe pour les lentivirus associée à la persistance virale et des stratégies d'évasion immunitaire (Desrosiers, 2001).

Les lentivirus ont dû trouver un moyen d'exprimer plusieurs gènes à partir d'une seule unité provirale. Ils ont donc développé différents mécanismes pour contourner cet obstacle. Il existe trois différentes stratégies pour générer une série d'ARNm à

partir d'un seul modèle soit, des sites alternatifs d'initiation de la transcription, l'épissage alternatif et des sites alternatifs de formation de l'extrémité 3'.

Tous les rétrovirus utilisent leur longues répétitions terminales ("Long Terminal Repeat" ou LTR) en 5' comme promoteur pour diriger la synthèse de l'ARN viral. Bien que la transcription rétrovirale soit dirigée par l'ARN polymérase II et une combinaison de facteurs spécifiques cellulaires et de promoteurs, certains virus codent pour leur propre activateur de transcription. De plus, tous les rétrovirus utilisent l'épissage alternatif de leur transcrit pleine longueur afin de produire la diversité d'ARNm viraux requis. Le transcrit pleine longueur des rétrovirus a trois fonctions distinctes. La première est qu'il constitue le génome du virus. Il peut aussi servir de modèle pour la traduction des gènes Gag et Gag-Pol. Finalement, il sert d'ARN précurseur pour la production de divers ARNm sous-génomiques (Modrich and Kräusslich, 2001 ; Shida, 2012).

Normalement, les pré-ARN messagers contenant des introns sont retenus au noyau par leur interaction avec des facteurs d'épissage jusqu'à ce qu'ils soient complètement épissés ou dégradés. Les ARN partiellement et non épissés des rétrovirus doivent faire face à cette problématique. Ces ARN contiennent au moins un intron, mais doivent entrer dans le cytoplasme pour servir de modèle pour la synthèse de certaines protéines telle que Env, Gag et Gag-Pol. Deux mécanismes post-transcriptionnels sont utilisés par les rétrovirus pour éviter la séquestration nucléaire de leur ARNm contenant un ou des introns et leur exportation dans le cytoplasme. Le premier mécanisme dépend d'un trans-activateur, la protéine virale Rev et est utilisé par tous les lentivirus ainsi que le virus T lymphotrope humain ("Human T-Lymphotropic virus" ou HTLV-I et II). Pour ce virus, la protéine se nomme Rex. Cette protéine interagit directement avec une cible agissant en cis, l'élément de réponse à Rev (RRE ou RxRE pour HTLV) qui est présent sur tout les ARNm non

complètement épissés. Le complexe induit leur exportation nucléaire. Le second mécanisme est utilisé par les autres rétrovirus. Il comprend une séquence ARN agissant en cis qui fonctionne indépendamment des protéines virales. Comme ces séquences interagissent directement avec les facteurs d'exportation des ARN cellulaires, ils ont été nommés éléments de transport constitutifs ("constitutive transport elements" ou CTEs). Plusieurs protéines cellulaires et virales portent un motif hydrophobe similaire au NES de Rev et de Rex. Ces éléments sont importants pour l'exportation nucléaire (Blissenbach *et al.*, 2010; Modrich and Kräusslich, 2001; Pollard and Malim, 1998).

1.3 Le virus de l'immunodéficience bovine

1.3.1. Historique

Le VIB fut découvert en 1969 chez une vache laitière gravide nommée R-29. Cette dernière montrait un nombre élevé de globules blancs, une lymphoadénopathie, des désordres neurologiques correspondant à des lésions du système nerveux central, une faiblesse progressive et un amaigrissement (Van Der Maaten *et al.*, 1972). Le virus isolé fut nommé virus visna-like bovin à cause de sa structure ressemblant à celle du virus Visna. Par la suite, il fut démontré que la souche R-29 bovine était un lentivirus présentant beaucoup de similarités avec le VIH de type 1. Le virus pris alors le nom de virus "immunodeficiency-like" bovin et finalement celui du virus de l'immunodéficience bovine (Gonda *et al.*, 1987).

1.3.2. Distribution

Des études ont montré la prévalence de l'infection par le VIB aux États-Unis, en Nouvelle-Zélande, en Suisse, en Australie, en Angleterre, en France, au Brésil, au

Pakistan et même au Japon (Meas *et al.*, 1998; Meas *et al.*, 2002; Scobie *et al.*, 2001; Madruga *et al.*, 2002). Au Canada, l'infection par le VIB a une fréquence de 5,5 à 12% pour les vaches de la province de l'Ontario (McNab *et al.*, 1994). Cependant, ailleurs en Amérique du Nord, la fréquence est parfois plus élevée pouvant atteindre 60% dans le sud des Etats-Unis. En Alberta, la séroprévalence est très faible. Cette situation pourrait être attribuable à l'élevage de bovins de boucherie qui nécessitent moins d'interventions (vaccins, traitements) ce qui réduit les risques de transmission du VIB. De plus, leur durée de vie est plus courte ce qui réduit aussi les risques de transmission (Gonzalez *et al.*, 2000).

1.3.3. Pathologies

Le VIB est apparenté aux lentivirus associés à des maladies inflammatoires chroniques (CAEV et EIAV) plutôt qu'à ceux causant une immunodéficience sévère (VIH, VIS et VIF). Une encéphalite, une altération du système immunitaire associée à des infections bactériennes secondaires et des lésions inflammatoires chroniques aux membres ont été associées à l'infection des bovins par le VIB (Snider *et al.*, 1997; Carpenter *et al.*, 1992). Une lymphadénopathie est aussi régulièrement observée chez les bovins infectés (Munro *et al.*, 1998). Une corrélation positive entre la présence d'anticorps dirigés contre le VIB et une baisse de la production laitière chez les vaches a aussi été montrée (McNab *et al.*, 1994).

Dans une étude portant sur des vaches inoculées par voie intraveineuse avec le VIB, une augmentation de la prolifération lymphocytaire dirigée contre la protéine Gag du VIB entre 2 et 6 semaines post infection (p.i.) a été observée ainsi qu'une augmentation du ratio $CD4^+/CD8^+$ suggérant une dysfonction du système immunitaire. Une infection subséquente avec le virus de l'herpès bovin de type 1 a montré une réponse en anticorps anti-herpès plus tardive ainsi qu'un titre

significativement inférieur. L'injection du vaccin contre le virus de la diarrhée bovine virale a aussi entraîné une réponse en anticorps neutralisants plus faible que chez les individus non infectés par le VIB. Ces résultats indiquent qu'une suppression du système immunitaire est présente chez les bovins infectés (Zhang *et al.*, 1997). De plus, la réponse à certains mitogènes est réduite dans les six mois suivant l'infection traduisant une déficience fonctionnelle des lymphocytes (Martin *et al.*, 1991). Certaines fonctions des monocytes de ces animaux sont aussi réduites en cas d'infection par le VIB, notamment le relâchement d'anions superoxyde, l'activité phagocytaire et la réponse chimiotactique (Onuma *et al.*, 1992).

L'infection de lapins de Nouvelle-Zélande avec le VIB induit différents changements cliniques, immunologiques et histopathologiques. Les changements cliniques comportent l'anorexie, la perte de poids, la diarrhée, une faiblesse musculaire, l'hypoalgésie ainsi que des torticolis. Les changements immunologiques se résument à un dysfonctionnement des cellules T et B. Au niveau histopathologie, une lymphadénopathie ainsi qu'une splénomégalie ont été observées (Kalvatchev *et al.*, 1998; Walder *et al.*, 2001; Pifat *et al.*, 1992).

1.3.4. Mode de transmission

Le VIB est transmis verticalement *in utero* ou horizontalement via l'échange de fluides corporels incluant le sang et le colostrum. Les vaches sont donc susceptibles d'être infectées lors de la vaccination si les aiguilles sont réutilisées. Le provirus a aussi été retrouvé dans le sperme des animaux infectés. L'insémination artificielle pourrait donc aussi contribuer à la propagation du virus. Bien que non démontré, il est aussi possible que des insectes puissent transmettre le virus en piquant des individus infectés (Munro *et al.*, 1998; Nash *et al.*, 1995a; Nash *et al.*, 1995b; Gradil *et al.*, 1999).

1.3.5. Tropisme

Les lentivirus peuvent être classés en trois groupes distincts selon leur tropisme. Dans le premier groupe qui comprend les lentivirus du mouton, de la chèvre et du cheval, ce sont les monocytes et les macrophages qui représentent les cellules cibles. Dans le deuxième groupe qui comprend le VIH, le VIF et le VIS, en plus des monocytes et des macrophages, les cellules T sont les cellules cibles. Le VIB et JDV font partie d'un troisième groupe dont les cellules cibles ne sont pas clairement définies (Heaton *et al.*, 1998).

L'ADN proviral du VIB a été détecté *in vivo* majoritairement dans les tissus neuronaux et les tissus lymphoïdes chez les bovins infectés. Il est aussi fréquemment détecté dans les poumons, les nœuds lymphatiques, la rate, le cœur, l'œsophage, le pancréas, les neurones, les cellules microgliales, les cellules des muscles lisses, les cellules endothéliales, les cellules mononucléées périphériques du sang (CMPS) et le sperme des animaux infectés. Le virus possède donc un tropisme cellulaire très large et serait pantropique (Zhang *et al.*, 1997). D'autres virus peuvent aussi infecter un large spectre de cellules, mais ne peuvent cependant pas exprimer leurs transcrits dans toutes les cellules infectées. Le VIB quant à lui peut exprimer ses transcrits dans toutes les cellules qu'il lui est possible d'infecter (Wu *et al.*, 2003).

Suite à une infection par le VIB (souche FL112) chez des vaches, une lymphocytose des cellules B a été observée, mais sans changement significatif dans les autres populations de cellules mononucléées dont les cellules CD4⁺ et CD8⁺ contrairement à ce qui est observé pour le VIH. Cependant, l'ADN proviral est présent dans ces cellules trois à six jours suite à l'inoculation et est encore détecté deux ans et demi plus tard (Whetstone *et al.*, 1997). Chez le lapin infecté expérimentalement, les lymphocytes du sang périphérique sont les premières cellules infectées par le VIB. Entre les troisième et sixième semaines post infection (p.i.), les nœuds lymphatiques

et la rate sont touchés. Finalement, quatre à sept mois p.i., le cerveau peut être atteint. Une réponse humorale est détectée deux à trois semaines p.i. chez ces lapins et ils demeurent séropositifs après douze mois. L'infection est donc persistante (Walder *et al.*, 2001). Des moutons ont aussi pu être infectés expérimentalement avec des résultats plus ou moins similaires (Hirai *et al.*, 1996).

In vitro, le BIV se réplique dans les cellules bovines, ovines, canines et de lapin (Bouillant *et al.*, 1989). Il induit un effet cytopathique caractérisé par la formation de syncytia dans les cellules permissives. L'expression des gènes viraux varie largement en fonction du type cellulaire suggérant que les facteurs cellulaires spécifiques sont requis pour que l'infection soit productive (Kempster *et al.*, 2002).

1.3.6. Organisation structurale et génomique du VIB

Le VIB est un virus enveloppé avec un diamètre de 120-130 nm. Son génome, composé d'ARN diploïde de 8482 nucléotides, est protégé par les protéines de la capsidie et de la nucléocapsidie. Autour, la protéine p16 forme une matrice elle-même entourée de l'enveloppe formée des protéines gp100 (SU) et gp45 (TM). D'autres protéines sont retrouvées dans la particule virale dont des protéases, la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (Figure 1) (Gonda *et al.*, 1994). Le VIB possède le génome le plus complexe des lentivirus non primates (Figure 2).

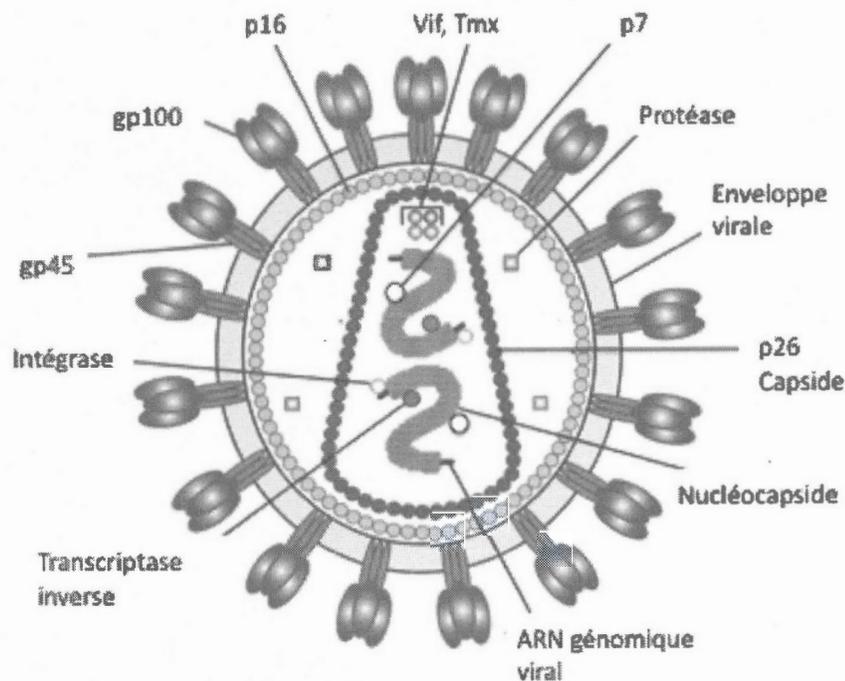


Figure 1.1 Organisation structurale du virus de l'immunodéficience bovine. p7 : protéine de la nucléocapside, p16 : protéine de la matrice, p26 : protéine de la capsid, gp100 : glycoprotéine de surface, gp45 : glycoprotéine transmembranaire.

Le génome du VIB sous sa forme provirale a une longueur de 8960 pb. Il contient les gènes rétroviraux obligatoires codant pour les protéines de structure (*gag*, *pol* et *env*), les LTR ainsi qu'une région centrale complexe commune au lentivirus située entre et chevauchant le cadre de lecture des gènes *pol* et *env*. Cette région centrale contient des exons codant pour des protéines non structurales souvent appelées protéines accessoires bien que certaines soient indispensables pour la réplication du virus (Gonda *et al.*, 1992).

La protéine Gag dérive de la traduction du transcrit viral pleine longueur. Le précurseur de Gag, Pr53, initie le bourgeonnement et l'incorporation de l'ARN génomique dans les particules en formation. Pr53 est clivé par des protéases pour

former trois produits majeurs qui sont p16 (protéine de la matrice), p26 (protéine de la capsid) et p7 (protéine de la nucléocapsid). Plusieurs petites protéines sont formées entre les sites de clivage, mais leur rôle demeure inconnu. Le précurseur de Gag-Pol est une protéine de 170 kDa. Les produits du gène *pol* sont une protéase (PR), la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN). Une quatrième protéine de 75 aa serait présente entre les sites de clivage de TI et IN. Chez d'autres lentivirus, cette région est associée à une activité dUTPase, mais pas dans le cas du VIB. Sa fonction demeure inconnue (Gonda *et al.*, 1994). Le gène *env* code pour les deux glycoprotéines de surface (SU ou gp100) et transmembranaire (TM ou gp45).

La régulation de la réplication virale dépend de facteurs agissant en *trans* qui interagissent avec le LTR. Ces éléments ressemblent aux promoteurs eucaryotiques puisqu'ils régulent l'expression des gènes et contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription (Gonda *et al.*, 1992). Les LTR contiennent trois régions, soit U3, R et U5. La région U3 contient des signaux d'initiation, d'amplification et de terminaison pour la transcription. La région R est présente sur tous les transcrits viraux et contient TAR ("Trans-Activation Responsive element"), une structure à laquelle se lie la protéine Tat pour augmenter la transcription. Fait intéressant, la région U3 contient une seule copie de plusieurs séquences putatives servant de site de liaison pour des facteurs de transcription. Une fois le provirus intégré, le LTR en 5' sert de promoteur pour le génome viral entier tandis que le LTR en 3' voit à la terminaison et à la polyadénylation des ARN viraux (Krebs *et al.*, 2001).

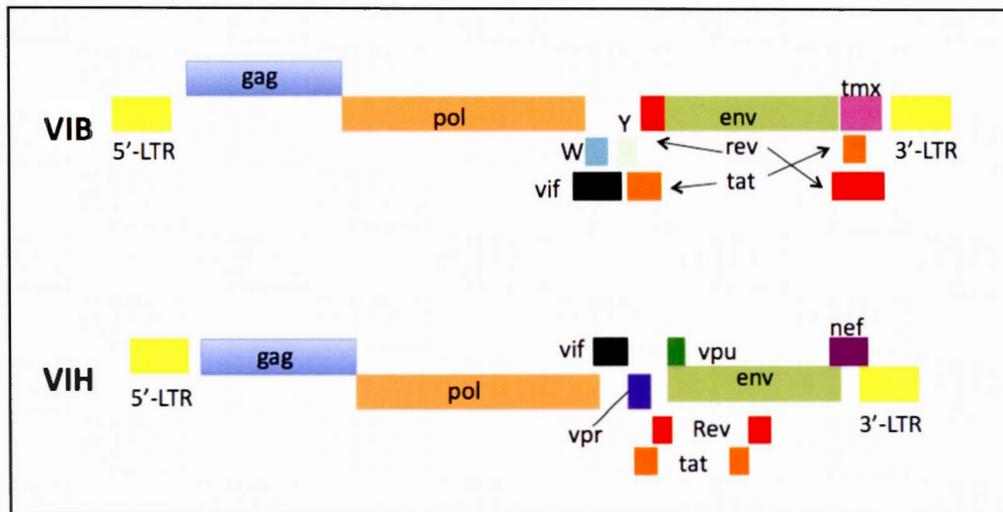


Figure 1.2 Organisation génomique du virus de l'immunodéficience bovine en comparaison de celle du virus de l'immunodéficience humaine. Les deux virus présentent une organisation similaire et très complexe avec un génome qui code pour plusieurs protéines accessoires et de régulation.

1.4. Cycle de réplication virale

La réplication du VIB débute par l'attachement du virus à son récepteur à la surface de la cellule via la protéine SU. Bien que non connu, le récepteur pourrait être le récepteur de chimiokines CCR5 (Wright *et al.* 2002). L'interaction entre SU et CCR5 entraîne alors un changement de conformation qui expose le domaine hydrophobe de la protéine TM. Cet événement mène à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire facilitant l'entrée du virus et le relâchement de la capsid virale dans le cytoplasme (Saint-Louis *et al.*, 2004). La décapsidation libère l'ARN génomique dans le cytoplasme où il est copié par la TI en ADN double brin. Le provirus ainsi formé est ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée via l'intégrase virale. Suite à un stimulus donné, le virus peut sortir de sa latence et synthétiser de nouveaux ARN viraux. La protéine d'enveloppe (Env) ainsi que les précurseurs de Gag et Gag-Pol produits migrent à la membrane plasmique où l'ARN

génomique est empaqueté durant le bourgeonnement des virions. La protéase virale clive ensuite les précurseurs Gag et Gag-Pol donnant la forme conique typique des lentivirus. Les virions peuvent alors infecter de nouvelles cellules (St-Louis *et al.*, 2004). Les étapes de la réplication sont illustrées à la figure 3.

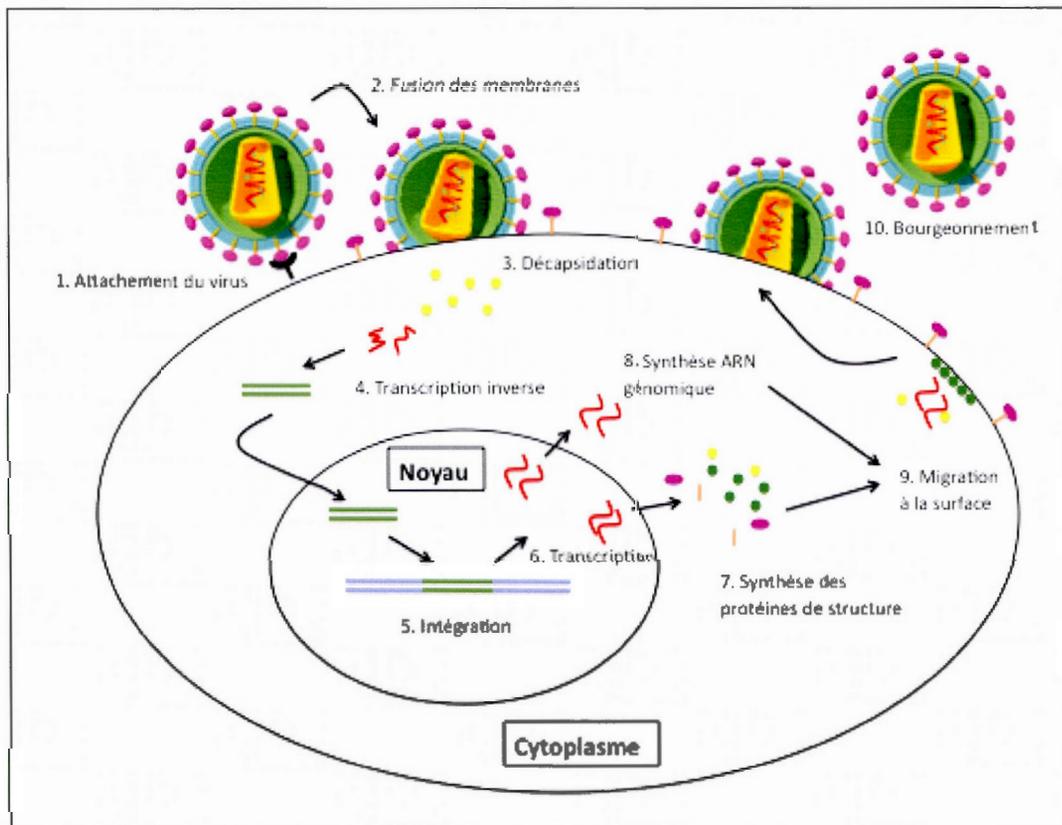


Figure 1.3 Le cycle de réplication des lentivirus. Après s'être attaché à son récepteur, la membrane du virus fusionne avec celle de la cellule pour libérer la capsid virale dans le cytoplasme. La décapsidation libère l'ARN génomique viral qui est aussitôt copié par la TI en ADN double brin. Le provirus ainsi formé est ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée via l'intégrase virale. Suite à un stimulus donné, le virus peut sortir de sa latence. L'ADN proviral est alors transcrit pour produire les ARN viraux. Certains transcrits seront épissés complètement dans la phase précoce pour produire les différentes protéines de régulation, d'autres partiellement ou non épissés dans la phase tardive pour produire les protéines de structure et l'ARN génomique. Les différents composants migrent à la membrane ou le virion s'assemble et se libère de la cellule par bourgeonnement.

1.5. Les protéines accessoires

Le génome du VIB code pour un grand nombre de protéines accessoires dont certaines sont exclusives à celui-ci. Les deux principales protéines qui ont un rôle clé dans la régulation de la réplication virale sont Tat ("Trans-Activator of Transcription") et Rev ("Regulator of Virion Expression"). Alors que Tat agit à titre d'activateur transcriptionnel, Rev régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en assurant le transport des transcrits d'ARN. La protéine Rev qui fait l'objet de notre étude sera traitée plus loin. Les autres protéines sont Vif, Vpy, Vpw et Tmx.

La protéine Tat provient d'un transcrit de 1.7 kb. Elle migre au noyau pour réguler à la hausse l'expression des gènes du VIB. Tat agit en se liant à une structure en épingle à cheveux, l'élément de réponse de trans-activation TAR, présent dans la région R des ARN viraux naissants et en recrutant certains facteurs de la cellule hôte dont la cycline T et Cdk9 (Goff, 2001). Tat recrute ensuite une série de complexes transcriptionnels incluant des enzymes avec une activité histone ou facteur acétyl transférase (HAT ou FAT) qui modifient la chromatine au site d'intégration de l'ADN proviral et le rend par le fait même propice à la transcription (Li *et al.*, 2005). Elle peut aussi recruter P-TEFb, un complexe kinase pouvant phosphoryler le domaine C-terminal de la polymérase II pour ajuster son activité. Tous les lentivirus possèdent une protéine Tat qui peut être classée selon deux groupes fonctionnels. Dans le premier groupe qui comprend le VIB, JDV, le VIH-1 et 2, le VIS et le VAIE, Tat exerce son rôle en augmentant le taux d'élongation plutôt que d'initier la transcription en utilisant l'ARN polymérase II cellulaire. Dans le deuxième groupe qui comprend le MVV, CAEV et le VIF, Tat agit via des sites de liaison des facteurs de transcription situés dans la région U3 des LTR (St-Louis *et al.*, 2004). La protéine exerce aussi deux autres rôles très différents. Elle peut induire l'apoptose et

l'inhibition de la formation des petits ARN d'interférence (siRNA) par la protéine Dicer (Li *et al.*, 2005).

La protéine Vif agit tardivement dans le cycle de réplication et est requise pour une production optimale des virions. Un rôle dans l'assemblage des virions a été suggéré. Chez le VIH, Vif est empaquetée dans les particules virales où elle est clivée par les protéases. Elle stabilise le complexe de nucléoprotéines par une interaction avec la région 5' des ARN viraux. De plus, elle module la TI via son domaine C-terminal en stimulant à la fois la liaison de la TI et de l'amorce ou en augmentant le taux de polymérisation de la TI (Li *et al.*, 2005). Lors de l'infection, il est connu que la protéine Vif induit la polyubiquitination et la dégradation protéasomale de la protéine APOBEC3 (A3) qui est un facteur de restriction de la cellule hôte (LaRue *et al.*, 2010).

Les gènes codant pour les protéines Vpw et Vpy sont situés dans le cadre de lecture ouvert du gène *vif*. Leur rôle demeure indéterminé, mais selon leur localisation génomique, ils pourraient avoir un rôle similaire aux protéines Vpr et Vpu du VIH-1. Chez ce virus, Vpr favorise le transport du complexe de pré-intégration de l'ADN viral dans le noyau des cellules qui ne sont pas en division. Elle cause aussi un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Vpu augmente le relâchement des particules virales en inactivant un facteur d'inhibition, TASK-1, par oligomérisation. Elle réduit aussi la formation de syncytium cellulaire en favorisant la dégradation des molécules CD4 (St-Louis *et al.*, 2004).

Le génome du VIB porte un dernier gène nommé *tmx* localisé presque au même endroit que le gène *nef* du VIH-1 sur leur génome respectif. La protéine Tmx a un poids moléculaire de 19 kDa et est détectée dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les virions (Gonda *et al.*, 1994). Elle est produite dans la phase précoce avec

Rev et Tat. Cependant, son rôle est toujours inconnu. Comme pour Vpy et Vpw, de par sa localisation, il est suggéré que la protéine Tmx aurait un rôle similaire à la protéine Nef du VIH-1. Nef affecte l'expression de plusieurs protéines cellulaires à la surface de la cellule infectée dont CD4, CD8, CD28, MHC-1 et 2. Elle interfère aussi avec différentes voies de transduction du signal dans la cellule infectée. Nef facilite le mouvement du nucléoïde à travers les microtubules qui forment une barrière potentiellement obstructive en réorganisant l'actine au niveau du cortex cellulaire lors de la sortie du virus. Finalement, Nef peut lier le cholestérol via un motif de reconnaissance à son extrémité C-terminale et le transporter au site de bourgeonnement où il est essentiel. Elle facilite donc la sortie du virus (Li *et al.*, 2005).

1.6. La protéine Rev

1.6.1. Les différents rôles de la protéine Rev

La protéine Rev exerce plusieurs rôles lors d'une infection par le VIH-1. Elle joue un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique, la polyadénylation et la stabilité des ARN viraux en plus d'être impliquée dans la traduction et l'encapsidation (Blissenbach *et al.*, 2010). Généralement, l'interaction de Rev avec des protéines cellulaires entraîne une cascade d'effets post-transcriptionnels dont l'inhibition de l'épissage des ARN viraux, l'activation de l'exportation nucléaire des ARN non épissés et une utilisation appropriée des ARN portant le RRE pour la traduction cytoplasmique (Suhasini and Reddy, 2009). Au niveau de la traduction, le complexe Rev-RRE interagirait avec le facteur d'initiation eucaryotique 5A (eIF5A). Des versions mutantes d'eIF5A ont prévenu la réplication du VIH-1 dans des cellules humaines. Le complexe interagit avec différentes ARN hélicases dont DDX1, DDX3 et DDX24 au nucléole (Groom *et al.*, 2009). DDX1 lie Rev et le RRE et augmente

leur activité. Il a été proposé que DDX1 soit un cofacteur cellulaire requis pour assurer le confinement de Rev dans les compartiments intracellulaires appropriés. DDX3 agit en liant la protéine CRM1 augmentant ainsi l'activité Rev/CRM1 par un mécanisme inconnu. Elle permet d'augmenter l'accumulation cytoplasmique des ARNm dépendant de Rev/RRE. DDX24 lie aussi Rev et est impliquée dans l'empaquetage des ARN viraux (Sahasini and Reddy, 2009). Une interaction entre Rev et la protéine hRIP ("Human Rev interacting protein") favorise le relâchement des ARN du VIH de la région périnucléaire (Sahasini and Reddy, 2009). D'autres interactions ont été observées, mais leur rôle demeure encore nébuleux (Hadian *et al.*, 2009).

Rev peut aussi interagir avec les microtubules et induire leur déstabilisation en créant des anneaux à leurs extrémités. La protéine a montré un fort effet inhibiteur sur la formation d'asters dans des extraits d'œuf de *Xenopus* démontrant sa capacité à interagir avec la tubuline en présence de niveaux normaux de constituants cellulaires. Cet effet coïncide avec la rupture des microtubules observée suite à une infection par le VIH-1 (Watts *et al.*, 2000). Pour le VAIE, la protéine Rev a été démontrée comme étant un facteur de virulence pouvant conférer un potentiel de réplication ou un phénotype différent au virus (Payne *et al.*, 2004).

Dans les cellules infectées, le niveau d'ADN viral non intégré peut aller jusqu'à 99%. Sur les 15 à 21 copies présentes dans la cellule, seulement une ou deux seront intégrées. Il a été montré que la protéine Rev est responsable de ce faible niveau d'intégration. Pour permettre l'intégration du provirus, l'intégrase virale (IN) interagit avec la protéine LEDGF/p75 ("lens epithelium-derived growth factor") et forme le complexe LEDGF/p75-IN. Rev entraîne la dissociation de ce complexe et se lie à l'IN bloquant l'interaction avec l'ADN et la reformation du complexe (Levin *et al.*, 2010a). Une étude a montré que le contrôle Rev-dépendant de l'intégration de l'ADNc du VIH est impliqué dans la résistance aux superinfections. En effet, ce

mécanisme bloque l'intégration d'ADNc supplémentaire lors d'une seconde infection par le même virus ou un virus apparenté (Levin *et al.*, 2010b).

Le rôle le mieux étudié de la protéine Rev est son implication dans le transport des ARN viraux (Figure 4). Au contraire des ARNm cellulaires, les ARNm rétroviraux évitent le couplage étroit qui existe entre l'épissage et l'exportation nucléaire ce qui permet aux transcrits contenant des introns d'être exportés au cytoplasme. Les lentivirus possèdent un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des gènes qui permet la formation des protéines virales de structure et de régulation de manière différente. Le mécanisme consiste en un système d'épissage complexe permettant de générer plusieurs espèces d'ARNm codant pour une variété de protéines virales à partir d'un seul transcrit. Les transcrits précoces sont complètement épissés et codent en outre pour les protéines de régulation dont Tat et Rev. Ils empruntent la voie d'exportation nucléaire TAP-dépendante pour gagner le cytoplasme et être traduits. Les transcrits tardifs partiellement ou non épissés codent pour les protéines retrouvées dans les particules matures telles que Gag, Pol et Env ainsi que l'ARN génomique. Ces derniers ne peuvent utiliser la voie d'exportation nucléaire TAP-dépendante. Afin de transporter les ARN partiellement et non épissés du noyau vers le cytoplasme, la protéine Rev, après sa synthèse, retourne au noyau et au nucléole via son NLS et NoLS. Elle se lie alors à une structure secondaire des ARN viraux appelé élément de réponse à Rev (RRE). Le complexe interagit ensuite avec la protéine CRM1 ("Chromosome Region Maintenance 1", aussi appelée exportine 1) qui assure le passage des ARN vers le cytoplasme où ils seront traduits à leur tour. Les ARN partiellement épissés donneront des protéines structurales et enzymatiques alors que les ARN non épissés représentent l'ARN génomique viral qui sera encapsidé lors de l'assemblage des nouveaux virions (Pollard et Malim, 1998 ; Yi *et al.*, 2002).

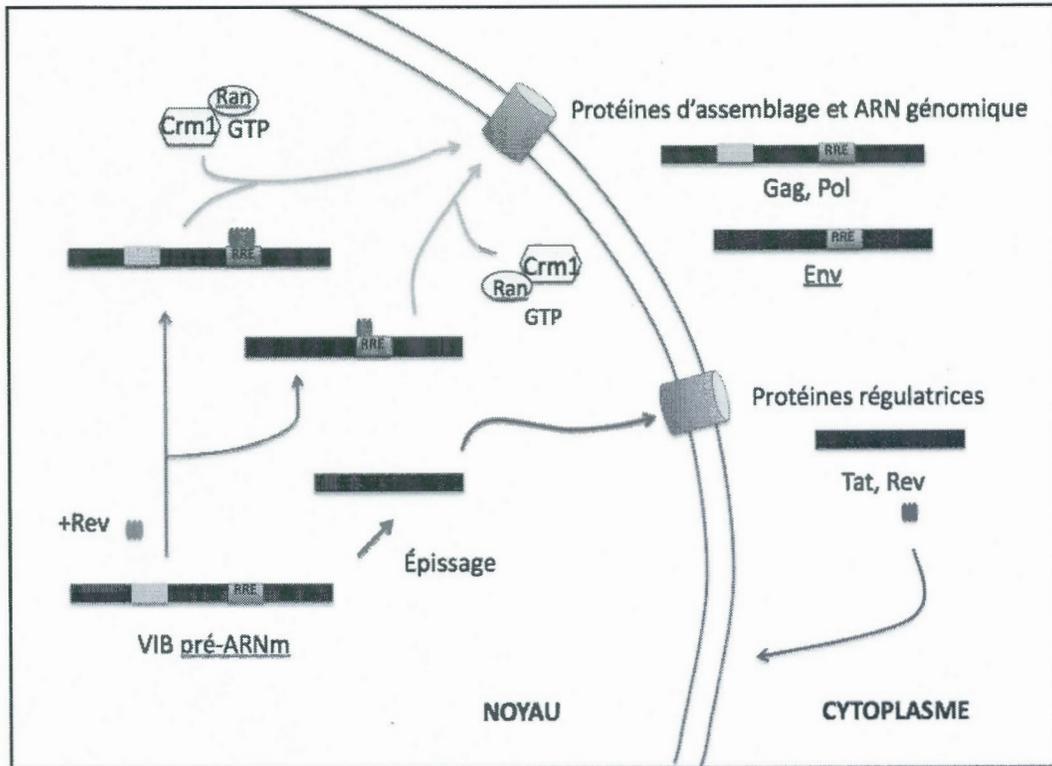


Figure 1.4 Rôle de la protéine Rev dans le transport des ARN viraux.

Lorsque transcrit, l'ARN viral est épissé avant de passer du noyau vers le cytoplasme via la voie d'exportation nucléaire TAP-dépendante où il sera transcrit pour produire les protéines de régulation telles que Tat et Rev. Ensuite, la protéine Rev retourne au noyau où elle se lie au RRE des ARN viraux partiellement et non épissés afin de permettre leur transport du noyau vers le cytoplasme via la voie d'exportation CRM1-dépendante. Ces ARN seront traduits pour produire les protéines de structure et l'ARN non épissé servant d'ARN génomique pour les nouveaux virions. Plus d'une protéine Rev doivent se lier au RRE sous forme de multimère afin de permettre le transport des ARN viraux.

1.6.2. Multimérisation de Rev et liaison au RRE

Le RRE est un élément hautement structuré situé dans la région du gène *env* du génome viral. Il est extrêmement conservé à travers les différentes souches d'un lentivirus donné. Il est présent sur tous les ARNm viraux partiellement et non épissés. Chez le VIB, la séquence formant pour le RRE est de 312 paires de base et se situe

entre les acides aminés (aa) 6992 et 7303 (Molina *et al.*, 2002). Cette interaction avec le RRE se fait via le domaine de liaison à l'ARN ("RNA binding domain" ou RBD). Différentes théories existent concernant la multimérisation de Rev et sa liaison au RRE. Certains soutiennent que Rev forme des multimères qui se lient ensuite au RRE (Malim et Cullen, 1991) alors que d'autres soutiennent que Rev se lie au RRE et recrute ensuite d'autres protéines pour former des multimères (Olsen *et al.*, 1990). Il semble que ces deux événements, soit la liaison au RRE et la multimérisation, soient distincts l'un de l'autre. Cependant, la capacité de former des multimères est déterminante dans la stabilité de la liaison au RRE. La protéine Rev doit donc être capable de former des multimères et doit pouvoir se lier au RRE pour accomplir sa fonction de transport des ARN viraux (Hoffman *et al.*, 2012). Une première protéine Rev se lie sur un site de haute affinité du RRE appelée "stem-loop IIB" via son domaine riche en résidus arginine (ARM). Le deuxième monomère se fixe sur un site adjacent de faible affinité appelé "Stem IIA". L'interaction entre les deux monomères pour former un dimère stabilise la liaison au site de faible affinité. D'autres monomères viennent s'ajouter de la même façon sur les autres sites disponibles. Une fois que tous les sites sont occupés (jusqu'à treize molécules de Rev ont été observées sur un même RRE), Rev peut alors passer du noyau vers le cytoplasme transportant avec elle l'ARN viral. La liaison d'un monomère seul avec le site de haute affinité n'est pas suffisante pour diriger l'exportation de l'ARN *in vivo* (Jain and Belasco, 2001). Il a été récemment montré que minimalement deux protéines Rev doivent être recrutées au niveau du RRE pour que le complexe d'exportation soit fonctionnel (Hoffman *et al.*, 2012). Le RRE servirait de matrice qui orchestre l'assemblage spécifique d'un oligomère Rev en utilisant une combinaison d'affinités provenant de la liaison à l'ARN et des interactions oligomériques. Le complexe formé influence à son tour la structure, le positionnement et la stœchiométrie du complexe d'exportation Rev-RRE/Crm1/RanGTP (Fernandes *et al.*, 2012).

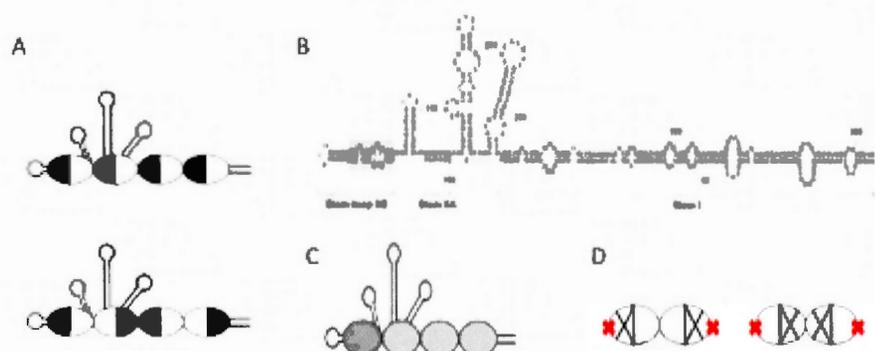


Figure 1.5 Modèle d'assemblage de la protéine Rev du VIH-1 au niveau du RRE suggéré par Jain et Belasco. (A) En haut, le modèle tête-à-queue et en bas le modèle tête-à-tête/queue-à-queue pour la multimérisation de Rev. Leur étude a montré que le deuxième modèle est le bon. (B) Schéma de la structure du RRE du VIH-1 avec ses différents domaines de liaison. (C) Modèle d'assemblage des protéines Rev sur le RRE. (D) Schéma expliquant la présence de dimères pour les mutants dont un des domaines de multimérisation est touché. Le X indique que le domaine a été muté. Tiré de Jain et Belasco (2001).

Un modèle d'assemblage de Rev du VIH-1 sur le RRE a été proposé par Jain et Belasco (2001) et est présenté à la Figure 5. Leur modèle suggère deux possibilités. La première, si l'on considère que la protéine Rev possède une "tête" et une "queue", suggère une interaction tête à queue. Le deuxième modèle suggère plutôt une interaction tête à tête et queue à queue avec les autres monomères. Les expérimentations ont montré que le deuxième modèle était celui à retenir car les protéines Rev déficientes pour un des deux domaines de multimérisation arrivaient tout de même à former des dimères (Jain and Belasco, 2001). En fait, la structure de RRE est légèrement plus complexe que ne le montre la Figure 5B. De plus, la cristallisation de la protéine Rev a permis d'élaborer de nouveaux modèles de multimérisation plus complexes (Appendice C) (Fernandes *et al.*, 2012).

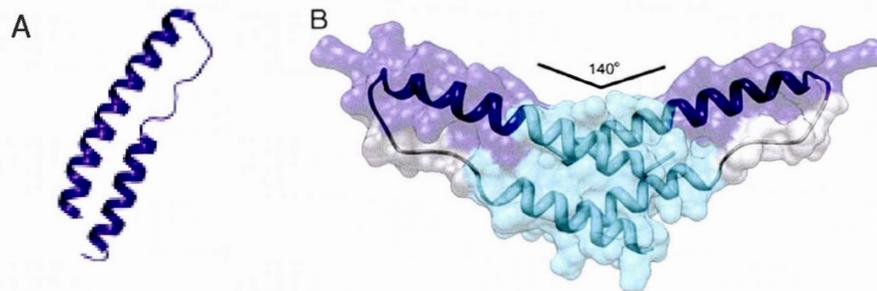


Figure 1.6 Structure tridimensionnelle de Rev. (A) Structure du domaine N-terminal de la protéine Rev du VIH-1. (B) Formation d'un dimère de Rev. La portion turquoise représente les domaines de multimérisation. La portion en bleu foncé représente le domaine de liaison à l'ARN. Image tirée de DiMattia *et al.*, (2010).

1.6.3. Domaines fonctionnels

La protéine Rev possède un domaine de liaison à l'ARN, le RBD qui se situe dans une région riche en arginines aussi appelée ARM pour "Arginine Rich Motif". Cette région contient notamment le signal de localisation nucléaire ("nuclear localisation signal" ou NLS). Les autres domaines sont le domaine de multimérisation (deux domaines pour VIH-1) et un domaine riche en résidus leucine nécessaires pour l'exportation nucléaire de Rev faisant partie du signal d'exportation nucléaire ("nuclear exportation signal" ou NES) (Daelemans *et al.*, 2004). La présence d'un NLS et d'un NES permet à Rev de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme pour permettre aux ARN partiellement épissés l'accès à la machinerie traductionnelle et rend l'ARN génomique disponible pour l'encapsidation. Les séquences consensus du NES sont classées sous deux catégories. Elles font partie de la classe Rev du VIH-1 ou de la classe PKI (Guttler *et al.*, 2010; Gomez Corredor and Archambault, 2012). Rev contient aussi un signal d'inhibition nucléaire ("Nuclear inhibition signal" ou NIS) qui sert à maintenir sa distribution dans le noyau et par conséquent sa propre activité (Suhasini and Reddy, 2009). Comme la protéine Rev est retrouvée

majoritairement dans le nucléole et le cytoplasme pour le VIH-1, elle possède aussi un signal de localisation nucléolaire ("Nucleolar Localisation Signal" ou NoLS) situé généralement dans la séquence du NLS (Kubota *et al.*, 1989; Cochrane *et al.*, 1990). Le domaine de multimérisation est riche en résidus hydrophobes qui sont soit responsables de la structure tridimensionnelle de la protéine (rapprochement des hélices alpha) soit de l'interaction entre deux protéines Rev (Figure 6) (DiMattia *et al.*, 2010).

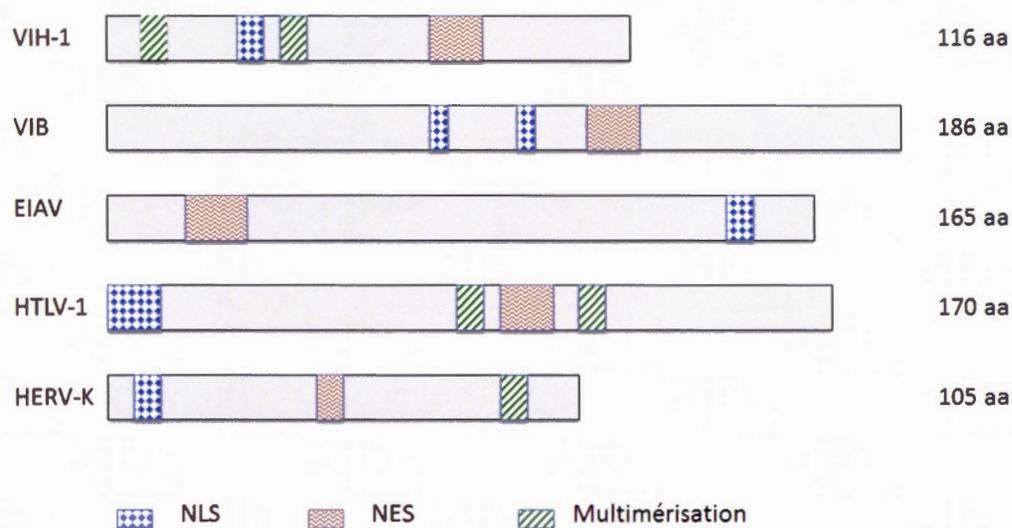


Figure 1.7 Domaines fonctionnels des protéines Rev et Rev-like des virus de la famille des *Retroviridae*. La protéine Rev possède différents domaines dans lesquels se trouve un signal de localisation nucléaire (NLS), un signal d'exportation nucléaire (NES) et un domaine de multimérisation.

L'organisation structurale de la protéine Rev diffère d'un virus à l'autre. Chez le VIH-1, le NES est localisé entre les aa 73 à 83, le NLS entre les aa 35 à 46 et le domaine de multimérisation entre les aa 12 à 22 et 52 à 60 (Böhnlein *et al.*, 1991; Bogerd and Greene, 1993; Fisher *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1996; Pollard and Malim, 1998; Jain and Belasco, 2001). Chez EIAV, le NES se situe entre les aa 31 à

55 et le NLS entre les aa 144 à 165 (Lee *et al.*, 2006). Pour le VIB, le NES se situe entre les aa 109 à 121 et le NLS entre les aa 71 à 74 et 95 à 101 (Gomez Corredor and Archambault, 2009; Gomez Corredor and Archambault, 2012). Pour ces deux derniers virus, le domaine de multimérisation n'est pas connu. D'autres protéines apparentées à Rev (Rev-like) possèdent aussi ces domaines fonctionnels. La protéine Rex du virus de la leucémie des cellules T humaine ("Human T-cell leukemia virus" de type 1 ou HTLV-1) possède un NLS situé entre les aa 1 à 19 et un NES entre les aa 79 à 99. Elle possède aussi un domaine de multimérisation bipartite situé entre les aa 57 à 66 et 106 à 124 (Heger *et al.*, 1998). Finalement, le rétrovirus endogène humain K ("Human endogenous retrovirus K" ou HERV-K) possède aussi une protéine avec une fonction similaire à Rev appelée Rec. Son NLS est situé entre les aa 13 à 20 et son NES entre les aa 53 à 59. Elle possède un seul domaine de multimérisation connu situé entre les aa 75 à 87 (Boese *et al.*, 2001). La Figure 7 illustre les domaines fonctionnels de ces différentes protéines.

1.6.4. Caractéristiques uniques de la protéine Rev du VIB

Récemment, plusieurs domaines fonctionnels ont été caractérisés chez la Rev du VIB. Étonnamment, malgré de nombreuses ressemblances avec le VIH-1, la protéine Rev du VIB présente plusieurs caractéristiques uniques. En effet, son NLS est bipartite (une première chez les rétrovirus pour les protéines Rev et Rev-like) et la séquence d'espacement entre les deux segments est de 20 acides aminés. Cette séquence d'espacement est normalement de 8 à 16 acides aminés pour les NLS courts et de 30 à 32 acides aminés pour les NLS longs (Romanelli and Morandi, 2012). À l'intérieur de cette séquence se trouve le NoLS. Le NoLS du VIB est aussi unique puisqu'il diffère de la séquence consensus observée pour les autres protéines virales et protéines cellulaires nucléolaires répertoriées, toute nature confondue (Gomez Corredor and Archambault, 2009). De plus, le NES présente aussi des différences

avec le VIH-1. Bien qu'il utilise aussi CRM1 comme récepteur pour l'exportation, le NES est de type inhibiteur de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKI) plutôt que du type de la Rev du VIH-1. Finalement, Rev du VIB est importée au noyau via la voie classique des importines α/β cytosolique et énergie-dépendante alors que la Rev du VIH-1 est importée via son interaction directe avec l'importine β ou la transportine (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Il est donc raisonnable de penser que le domaine de multimérisation soit aussi différent.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cellules et milieu de culture

Des cellules épithéliales rénales embryonnaires humaines (HEK 293T) ("ATLL :American Type Culture Collection"; CRL-3216), des cellules Vero provenant de rein de singe vert d'Afrique (ATCC; CCL-81) et des cellules permissives au VIB, soit des cellules primaires de poumon de fœtus bovin (FBLU) ont été maintenues dans des flacons de culture cellulaire de 75 cm³ (Sarstedt, Newton, North Carolina) à l'aide du milieu DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) avec glucose (4,5 g/L) et L-Glutamine (Wisent, St-Jean-Baptiste, Québec) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) et des antibiotiques dans un environnement humide à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les passages cellulaires ont été effectués deux fois par semaine.

2.2 Obtention des mutants de délétion

Les mutants de délétion ont été obtenus par PCR-ligation-PCR. Pour le premier mutant, les 30 premiers acides aminés ont été délétés. Pour les mutants suivants, 20 acides aminés ont été délétés sauf pour le mutant 9 où 16 acides aminés ont été délétés (Figure 8).

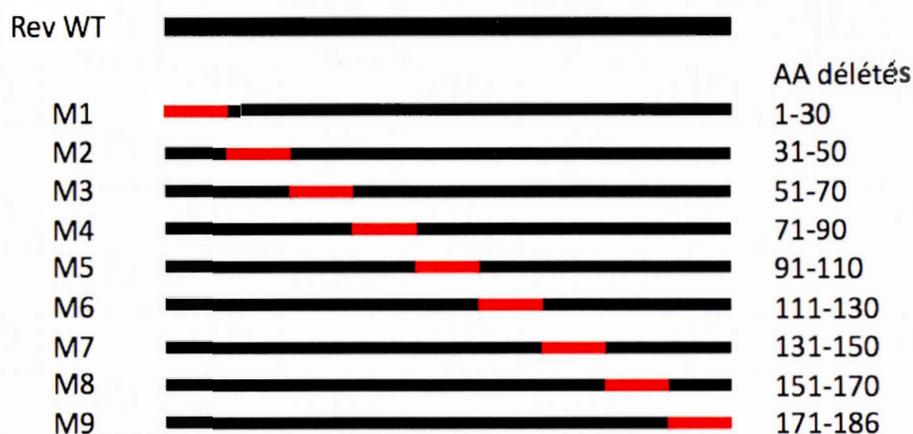


Figure 2.1 Mutants de délétion de la protéine Rev du VIH3. Les séquences délétées sont indiquées en rouge.

L'amplification des ADNc codant pour les différentes protéines Rev mutantes a été réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne ("polymerase chain reaction" ou PCR) à l'aide des amorces oligonucléotidiques appropriées (Tableau I). Les mutants M1 et M9 ont été obtenus après une seule PCR avec les amorces 2 et 3 et les amorces 1 et 18 respectivement. Les autres mutants ont été obtenus suite à deux différentes PCR amplifiant leurs extrémités N-terminale et C-terminale. Les deux extrémités ont ensuite été assemblées par ligation puis amplifiées lors d'une seconde PCR. L'amplification de 2 ng d'ADNc à partir de Rev WT fut effectuée avec 2,5U de la *OneTaq* polymérase (NEB, Ipswich, Massachusetts), 0,2 μ M de chaque amorce, du tampon de réaction One Taq standard 1X (NEB) et 0,2 mM de dNTP dans un volume final de 50 μ L. Les échantillons ont été déposés dans un thermocycleur (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Les tubes furent chauffés à 94°C pendant 5 minutes, puis 30 cycles successifs de températures furent effectués comprenant une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 secondes, un appariement des amorces à 52°C pendant 45 secondes et la synthèse des brins complémentaires à 72°C pour 1 minute. Une période d'extension finale à 72°C

pendant 5 minutes fut effectuée. Les produits de PCR ont été analysés et purifiés sur un gel d'agarose 1% puis extraits à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN en suivant le protocole du fournisseur (NucleoSpin Extract Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Hoerdt, Alsace). Pour les mutants M2 à M8, les extrémités ont été assemblées par ligation. Pour ce faire, 200U de T4 DNA Ligase (NEB) furent mélangés à 2 μ L de chaque ADNc amplifié et le tampon de réaction de la T4 ligase 1X (NEB) pour un volume final de 10 μ L. Le mélange a été incubé pour la nuit à température pièce. Une seconde PCR avec les amorces 1 et 2 a permis de générer les mutants M2 à M8.

Tableau 2.1. Amorces nucléotidiques employées pour le développement des clones de Rev dans le vecteur pET-21b(+).

Amorce	Séquence nucléotidique de l'amorce 5'→3'
1 Rev 5'	gtcgaattccatggatcaggacct
2 Rev 3'	tgctcgagtgcttttgttcctggat
3 Rev M1 5'	tgcttagcatgacagccagagaag
4 Rev M2 3'	Pho-cagcctcccttcgtgatctc
5 Rev M2 5'	Pho-ctgccaaggtcagccaga
6 Rev M3 3'	Pho-cttctaatacactaggaga
7 Rev M3 5'	Pho-agagccagaaagctccccgg
8 Rev M4 3'	Pho-gtgtccccgtcctcct
9 Rev M4 5'	Pho-gttgaacaaaataggaga
10 Rev M5 3'	Pho-caattctcgtagagacttc
11 Rev M5 5'	Pho-cagcttgaggatcttgttcg
12 Rev M6 3'	Pho-ttgtattcttctgtccagacc
13 Rev M6 5'	Pho-gcttccgttcttctgttaacc
14 Rev M7 3'	Pho-tgaaggagttgaggggtcag
15 Rev M7 5'	P-tcctattttaaactaaaagggtg
16 Rev M8 3'	Pho-gcgtggcggaagatgtcca
17 Rev M8 5'	Pho-gccccggacttcccatatg
18 Rev M9 3'	gctcgagtgtgttgcctgagg
19 Rev230 5'	gcaattcaatggcaggaagaagc
20 Rev 230 3'	ggctcgagtttgttcctggat

*Pho signifie que les amorces sont phosphorylées à leur extrémité 5'. Les extrémités phosphorylées permettent de lier les deux fragments de chaque mutant ensemble via l'action de la T4 ligase.

Les différents mutants ont aussi été amplifiés avec une seconde paire d'amorces pour les insérer dans les vecteurs BiFC (Tableau II).

Tableau 2.2. Amorces nucléotidiques employées pour le développement des clones de Rev dans les vecteurs BiFC.

Amorce	Séquence nucléotidique de l'amorce 5'→3'
1 BiFC 5'	gtcgaattccatggatcaggacct
2 BiFC 3'	tgctcgagtgcttttgtccctggat
3 BiFC M1 5'	tggctagcatgacagccagagaag
4 BiFC M9 3'	cagcctcccttcggtgatctc
5 BiFC HIV 5'	ctgcgccaaggtcagccaga
6 BiFC HIV 3'	cttcttaacatacctaggaga

2.3 Construction des plasmides

Les séquences mutantes et "wild type" (WT) ainsi que la séquence de Rev du VIH-1 (utilisé comme témoin positif) ont d'abord été sous-clonées dans le vecteur pET-21b(+) (Novagen, Darmstadt, Germany) entre les sites de restriction EcoRI et XhoI (NheI et XhoI pour le mutant M1). Pour ce faire, les ADNc amplifiés par PCR ont été digérés avec EcoRI (ou NheI) et XhoI. Dans un tube, 30 µL d'ADNc ou du vecteur pET-21b(+) ont été mélangés au tampon CutSmart 1X (NEB) ainsi qu'à 10U de chacune des enzymes de restriction pour un volume final de 50 µL. Le produit de la digestion a ensuite été vérifié et l'ADN purifié sur gel d'agarose 1% puis extrait avec le kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel). Une ligation a été effectuée pour insérer l'ADNc digéré dans le vecteur pET-21b(+). Un volume de 3 µL d'ADNc a été mélangé à 1 µL du vecteur digéré ainsi que 200 U de T4 DNA Ligase (NEB) et le tampon de réaction de la T4 Ligase 1X (NEB) pour un volume final de 10 µL. L'insertion de l'ADNc dans ce vecteur ajoute une étiquette 6-Histidine à l'extrémité C-terminale des protéines. Des bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α-FT Ultramax (Gibco BRL) ont été transformées en ajoutant 5 µL du produit de ligation

au tube de bactéries. Après une incubation de 30 minutes sur glace, un choc thermique à 42°C pendant 1 minute fut effectué, suivi d'une incubation de 2 minutes sur glace. Par la suite, 200 µL de milieu de culture Luria-Bertani (LB) furent ajoutés et les tubes furent mis à 37°C pendant 2 heures avec agitation. Les bactéries ont ensuite été étalées sur des pétris de 100 x 15 mm contenant du milieu LB (1,5% Agar, 100 µg/ml d'ampicilline). Les pétris furent incubés en position inversée toute une nuit à 37°C. Une mini extraction plasmidique par lyse alcaline a été utilisée. Tout d'abord, 3 mL de milieu de culture LB contenant 200 µg/µl d'ampicilline furent inoculés avec une des colonies ayant poussé sur les pétris, puis incubé à 37°C avec agitation constante de 250 rpm (Environ Shaker, Lab-line instruments, Melrose Park, Illinois). Ensuite, 1,5 mL de chaque culture bactérienne a été centrifugée à 6 500 x g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot a été resuspendu avec 100 µL de la solution P1 (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/mL RNase A). Les bactéries ont ensuite été lysées par l'ajout de 100 µL de la solution P2 (0,2 M NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate ou SDS). Puis, 100 µL de la solution P3 (3 M KOAc et 2 M acide acétique glacial) furent ajoutés et le mélange fut incubé sur glace pour 10 minutes avant d'être centrifugé à 11 000 x g pour 10 minutes à la température de la pièce. Pendant la centrifugation, les colonnes ont été préparées en plaçant une bille en verre dans un tube Eppendorf de 0,5 mL dont l'extrémité a été coupée et placé lui-même dans un tube de 2 mL. Un volume de 400 µL d'une suspension de terre de diatomée (Annexe 3) a été ajouté dans la colonne avant de la centrifuger à 11 000 x g pour 1 minute. Le surnageant a été mélangé à 300 µL de tampon de liaison (500 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM EDTA pH 8.0, 6 M guanidine hydrochloride) et a été déposé sur la colonne puis centrifugé à 11000 x g pour 1 minute. La colonne a ensuite été lavée avec 600 µL de la solution de lavage (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA pH 8.0, 200 mM NaCl, éthanol 58%) suivie de 2 centrifugations d'une minute à 11 000 x g pour retirer le surplus de tampon. La colonne a été transférée dans un nouveau tube pour recueillir l'ADN qui a été élué par l'ajout de 30 µL de tampon TE

0,1X (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage via le service de séquençage de l'Université McGill (CIGQUMcG pour Centre Innovation Génome Québec de l'Université McGill, Québec, Canada).

L'ADNc de la protéine Rev du VIB a aussi été inséré dans les vecteurs BiFC-VC155 et BiFC-VN155 (I152L) (Addgene, Cambridge, MA) entre les sites EcoRI et XhoI. Ces vecteurs contiennent respectivement l'extrémité C-terminale et N-terminale de la protéine de fluorescence Vénus. Ils permettent de visualiser l'interaction entre deux protéines. Cette technique porte le nom de fluorescence bi-moléculaire par complémentation (Figure 9). La mutation I152L du vecteur VN155 permet de réduire l'association spontanée des deux extrémités de la protéine fluorescente et donc de réduire le bruit de fond. De plus, le vecteur BiFC-VC155 porte une étiquette HA et BiFC-VN155 une étiquette Myc favorisant la détection des fragments protéiques exprimés avec des anticorps anti-HA et anti-Myc.

2.4 Production des protéines Rev dans un système bactérien

Des bactéries compétentes Rosetta-gami B (DE3) pLysS (Novagen, Carlsbad, New Mexico) ont été transformées avec les constructions Rev-pET-21b(+) en suivant le même protocole que pour les bactéries DH5 α -FT. Par la suite, des cultures bactériennes de 5 mL de milieu LB-Broth avec ampiciline (200 μ g/ μ l) ont été cultivées jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₀₀ de 0.6. Les bactéries ont ensuite été induites avec 0,5, 1 ou 2 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant une, deux ou trois heures afin d'évaluer le temps optimal d'induction et la concentration optimale d'IPTG. Les bactéries ont ensuite été recueillies par centrifugation à 6 500 x g pour 15 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans un tampon d'extraction commercial BugBuster (Merck Millipore, Darmstadt,

Allemagne). Après une centrifugation de 30 minutes à 20 000 x g, le surnageant a été récupéré et mélangé à du tampon de chargement bleu 6x contenant du 2- β -mercaptoéthanol (1 : 5). Un volume de 5 μ L a été déposé dans un puits pour chaque temps et chaque concentration sur un gel dénaturant (SDS-PAGE) 12,5%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie ou transféré sur membrane de nitrocellulose pour effectuer un immunobuvardage de type Western Blot. Une fois la mise au point terminée, un volume de culture bactérienne de 100 mL a été utilisé pour la production de protéines ainsi qu'une concentration de 1 mM d'IPTG et un temps d'induction de 3 heures.

2.5 Purification des protéines

Pour la purification, des colonnes Micro Bio-Spin (Bio-Rad, Hercules, CA) ont été utilisées avec la résine Profinity IMAC Ni-Charged (Bio-Rad). La résine a été équilibrée avec le tampon de lavage (PBS 1X pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM 2- β -mercapto-éthanol, 0,5% NP40, 30 mM Imidazole). Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon d'extraction commercial BugBuster (Novagen). Pour ce faire, un volume de 2 ml de BugBuster a été ajouté au culot bactérien pour le resuspendre. Du lysozyme (1 mg/ml) et de la benzonase (2.5 U) ont par la suite été ajoutés et le tout fut incubé 20 minutes à température ambiante avec agitation. Après une centrifugation de 30 minutes à 20 000g, le surnageant a été récupéré et mélangé à la résine prééquilibrée (200 μ L) ainsi que du 2- β -mercaptoéthanol (5 mM), du NaCl (300 mM) et du NP-40 (0,5%). Le tout a été placé sur un agitateur rotatif à 4°C pendant 2 heures pour l'étape de liaison. La résine a ensuite été déposée sur les colonnes. Ensuite, quatre lavages ont été effectués avec 1 mL du tampon de lavage suivi de quatre éluions avec 100 μ L du tampon d'éluion (300 mM imidazole, 300 mM NaCl) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) . Afin de vérifier la purification, 10 μ L d'éluat pour chaque mutant a été déposé sur un gel

dénaturant (SDS-PAGE) 12,5%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie ou transféré sur membrane de nitrocellulose pour effectuer un immunobuvardage de type Western Blot.

2.6 Essai de multimérisation *in vitro*

2.6.1 Dosage protéique

Avant d'effectuer l'essai, les protéines ont été dosées par la technique de Bradford avec un kit commercial (BioRad). Pour ce faire, 5 μ L de chaque échantillon ont été déposés dans deux puits (duplicata) d'une plaque 96 puits à fond plat (Sarstedt). Ensuite, 25 μ L de la solution A contenant 20 μ L/mL de la solution S ont été ajoutés dans chacun des puits ainsi que 200 μ L de la solution B. La plaque a été incubée à l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes avant de lire l'absorbance à 750 nm à l'aide d'un lecteur de plaque. Pour chaque dosage, une courbe standard a été effectuée avec des concentrations connues d'albumine de sérum bovin ("bovine serum albumin" ou BSA) allant de 0 à 2 mg/mL.

2.6.2 Essai avec le glutaraldéhyde

Pour l'essai *in vitro*, 5 μ g des protéines Rev mutantes et WT ont été déposées dans des tubes de 0,5 ml avec une concentration finale de glutaraldéhyde de 0,002% dans un volume final de 20 μ l qui fut complété avec une solution tamponnée de saline (PBS pour "Phosphate Buffered Saline"), pH 7.4. Les échantillons ont été placés à 25°C (température ambiante) pour 0, 2 et 15 minutes. La réaction a été arrêtée en ajoutant 5 μ l de tampon Tris-HCl 1M pH 8,0 et 5 μ l de tampon de Laemmli 5X (Zapp *et al.*, 1991). Les échantillons ont ensuite été chauffés durant 1 minute à 100°C et séparés sur un gel SDS-PAGE 12,5%. Le test a été répété trois fois.

2.6.3 Immunobuvardage de type Western Blot

Un Western Blot a été effectué afin d'observer la présence de multimères. Un mutant pour lequel la protéine Rev reste sous forme de monomères et de dimères majoritairement sera considéré comme non multimérisé. La région absente dans ce mutant sera donc considérée comme faisant partie du domaine de multimérisation. Suite au transfert sur membrane de nitrocellulose, celle-ci a été bloquée avec du lait écrémé 5% contenant du Tween 20 0,1% toute une nuit à 4°C. Ensuite, un volume de 10 mL d'une dilution 1:2 000 d'un anticorps de lapin anti-histidine (Santa Cruz, Dallas, Texas) ou anti-Rev (disponible au laboratoire) dans du lait 5% a été déposé sur la membrane. Le tout a été incubé 90 minutes à température ambiante avec agitation constante. La membrane a été lavée à quatre reprises avec 10 mL de PBS 1X contenant du Tween 20 0,1%. Le Tween 20 fut ajouté pour favoriser des lavages plus efficaces afin de réduire le bruit de fond. Un volume de 10 mL d'une dilution 1:5 000 d'un anticorps de souris anti-lapin conjugué à la peroxydase du raifort (Santa Cruz) dans du lait 5% a été déposé sur la membrane et incubé 60 minutes avec agitation à température pièce. La membrane a ensuite été lavée comme décrit précédemment. Un substrat de révélation (Clarity Western ECL substrate de BioRad) a été préparé en mélangeant 1 mL de la solution de peroxyde avec 1 mL du substrat Luminol. Le mélange a ensuite été déposé sur la membrane et incubé pendant 5 minutes. En présence du peroxyde, l'enzyme peroxydase catalyse l'oxydation du luminol qui génère alors de la lumière. Ce phénomène est appelé chimiluminescence. Le signal lumineux produit a été détecté en utilisant des films d'autoradiographie HyBlot CL (Denville Scientific, Metuchen, New Jersey).

2.7 Essai de multimérisation en culture cellulaire

2.7.1 Transfection

Le jour avant la transfection, des cellules HEK 293T ont étéensemencées à raison de 5×10^4 cellules/puits dans des plaques 24 puits (Sarstedt, Newton, NC) contenant des lamelles rondes de 12 mm de diamètre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) au fond. Lorsque les cellules atteignaient une confluence de 50%, elles étaient transfectées. Pour ce faire, 0,5 μg de chaque vecteur (VC et VN) ont été mélangés avec l'agent transfectant "X-tremeGENE 9" (Roche) dans un ratio 2 : 1 (μl / μg ADN) et du DMEM (Wisent) frais pour obtenir un volume final de 100 μL . Le mélange a été incubé à la température de la pièce pendant 20 minutes puis ajouté dans le puits correspondant. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, 5% CO_2 pour 24 heures. Tous les tests ont été effectués en duplicata et répétés au moins 3 fois.

2.7.2 Immunofluorescence

Afin de vérifier le niveau d'expression des protéines Rev, leur localisation ainsi que l'efficacité de transfection, un test d'immunofluorescence a été effectué. Les cellules transfectées ont été fixées par l'ajout de 0,5 mL de paraformaldéhyde 4% (PAF) pour 15 minutes sous la hotte. Après trois lavages de 5 minutes avec 0,5 mL de PBS 1X, une solution de blocage (PBS 1X, BSA 4%, TritonX-100 0,3%) a été ajoutée dans tous les puits, suivi d'une incubation à 37°C pour 1 heure. Un anticorps (1 : 250) dirigé contre les étiquettes moléculaires HA (HA-Tag/Alexa647#2279S) ou MYC (Myc-Tag/Alexa488#3444S) et couplé à une molécule fluorescente a été ajouté au puits (Cell Signaling, Danvers, MA) pour une incubation à 37°C pendant 2 heures. Des lavages ont été effectués avec du PBS 1X avant de monter les lames. Pour ce faire, une goutte de « Prolong Gold antifade Reagent » contenant du DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA) a été déposée sur une lame de microscope. La lamelle portant les cellules a ensuite été déposée sur la goutte. Les lames ont été placées à

l'abri de la lumière et de l'humidité afin de sécher pendant 24 heures. Elles ont ensuite été conservées à 4°C avant l'analyse microscopique.

2.7.3 Fluorescence par complémentation

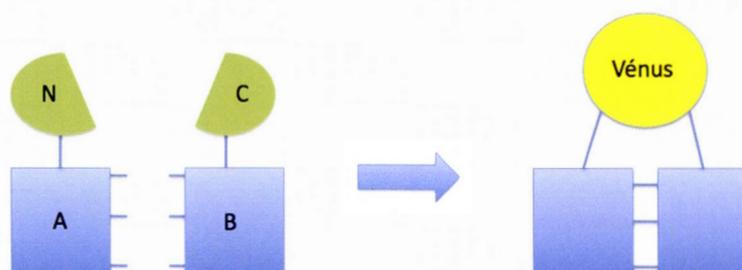


Figure 2.2 Principe de la fluorescence par complémentation. Si la protéine A interagit avec la protéine B, les extrémités C-terminale et N-terminale de la protéine de fluorescence Vénus seront suffisamment proches pour reformer la protéine de fluorescence entière. Un signal de fluorescence sera alors détecté.

Dans le but de déterminer le meilleur moment pour fixer les cellules, les protéines Rev WT du VIB et du VIH-1 (Rev 230) dans les vecteurs BiFC ont été utilisées pour transfecter des cellules HEK 293T dans des chambres de culture Labteck (Fisher Scientific). Les cellules ont été observées au microscope en temps réel entre 4 et 12 h et entre 12 h et 24 h après transfection pour Rev WT et Rev 230. Pour réaliser le test BiFC avec tous les mutants, les cellules transfectées ont finalement été fixées 24 heures suivant la transfection et montées sur des lames comme mentionné précédemment. Avant de monter les lames, les noyaux ont été marqués au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué 1/8 000 dans du PBS pendant 3 minutes. Ensuite, trois lavages avec du PBS ont été effectués.

2.7.4 Analyse des résultats

Les lames ont été observées au microscope à fluorescence Eclipse Ti (Nikon). Pour l'efficacité de transfection, les cellules positives (vertes ou rouges) et les cellules

négatives (pas de fluorescence) ont été dénombrées à partir de photos prises au microscope. L'efficacité de transfection représente le nombre de cellules transfectées avec les deux vecteurs (couleur orangé) sur le nombre de cellules totales. Le niveau d'expression a été quantifié qualitativement en fonction de l'intensité de fluorescence des marqueurs. La localisation de la protéine Rev a été déterminée par la présence de fluorescence dans les différents compartiments de la cellule.

Pour la complémentation, la présence de fluorescence verte indiquait une dimérisation. Les lasers ont été ajustés avec le témoin positif (Rev du HIV-1) et n'ont pas été modifiés par la suite pour la prise de données des autres protéines pour ne pas biaiser l'intensité du signal observé. L'intensité de fluorescence a été mesurée avec le programme d'analyse d'image Image J (Rasband, 1997-2004). L'intensité de fluorescence a été mesurée dans différentes cellules (entre 5 et 10 cellules pour chaque lame) et la moyenne a été calculée tout en soustrayant la moyenne du bruit de fond.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Production et purification de la protéine Rev

Pour déterminer la nature des domaines de multimérisation de la protéine Rev du VIB, un essai de multimérisation *in vitro* a été fait. Pour ce faire, des plamides ont été construits afin d'exprimer la protéine Rev avec une étiquette 6-His chez *E. coli*, tel que décrit dans la section 2.3. Afin de déterminer le temps optimal d'induction pour la production de protéines, des cultures ont été induites avec 1 mM d'IPTG et incubées à 37°C pendant différentes périodes de temps. Les culots bactériens ont été resuspendus dans du tampon BugBuster et 10 uL ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 12%. La Figure 10 montre une augmentation de la quantité de protéines produites en fonction du temps. Une induction de trois heures a donc été effectuée pour les étapes subséquentes. Différentes concentrations d'IPTG (0,5 mM, 1 mM ou 2 mM) ont aussi été testées pour l'induction des bactéries. Aucune différence n'a été observée dans la quantité de protéines produites pour un temps donné pour les différentes concentrations d'IPTG (données non montrées). La concentration moyenne (1 mM) a donc été utilisée pour les inductions suivantes.

Au niveau de la purification des protéines, une grande quantité de protéines était toujours présente dans le culot après la lyse avec le tampon de lyse (Figure 11). Comme le temps d'induction est long (3 heures), il se peut que la protéine se soit retrouvée dans des corps d'inclusion. Une sonication aurait pu permettre une extraction plus efficace des protéines. Cependant, la quantité de protéines récupérée dans le surnageant était amplement suffisante pour effectuer les étapes subséquentes.

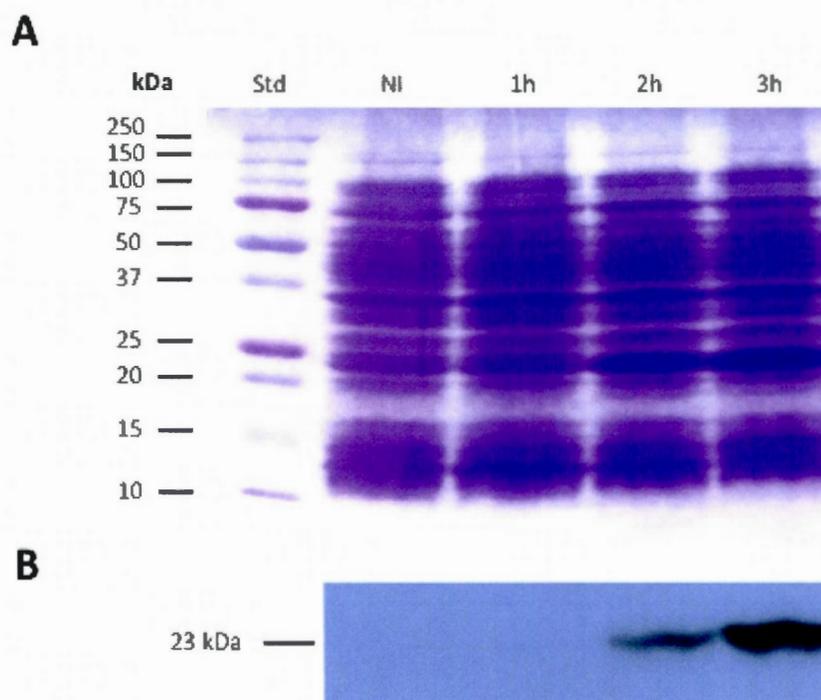


Figure 3.1 Expression de la protéine Rev WT. (A) Gel de polyacrylamide 12% avec SDS des fractions obtenues par induction de la protéine recombinante Rev WT du VIB dans des bactéries *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) pLysS coloré au bleu de Coomassie. Le puits 1 contient le standard de poids moléculaire (Std). Les puits suivants contiennent le lysat des bactéries exprimant le plasmide pET-21(b+)RevWT sans induction (NI) et à des temps d'induction de 1h, 2h ou 3h. (B) Confirmation de la présence de la protéine par Western Blot en utilisant un anticorps anti-His₆.

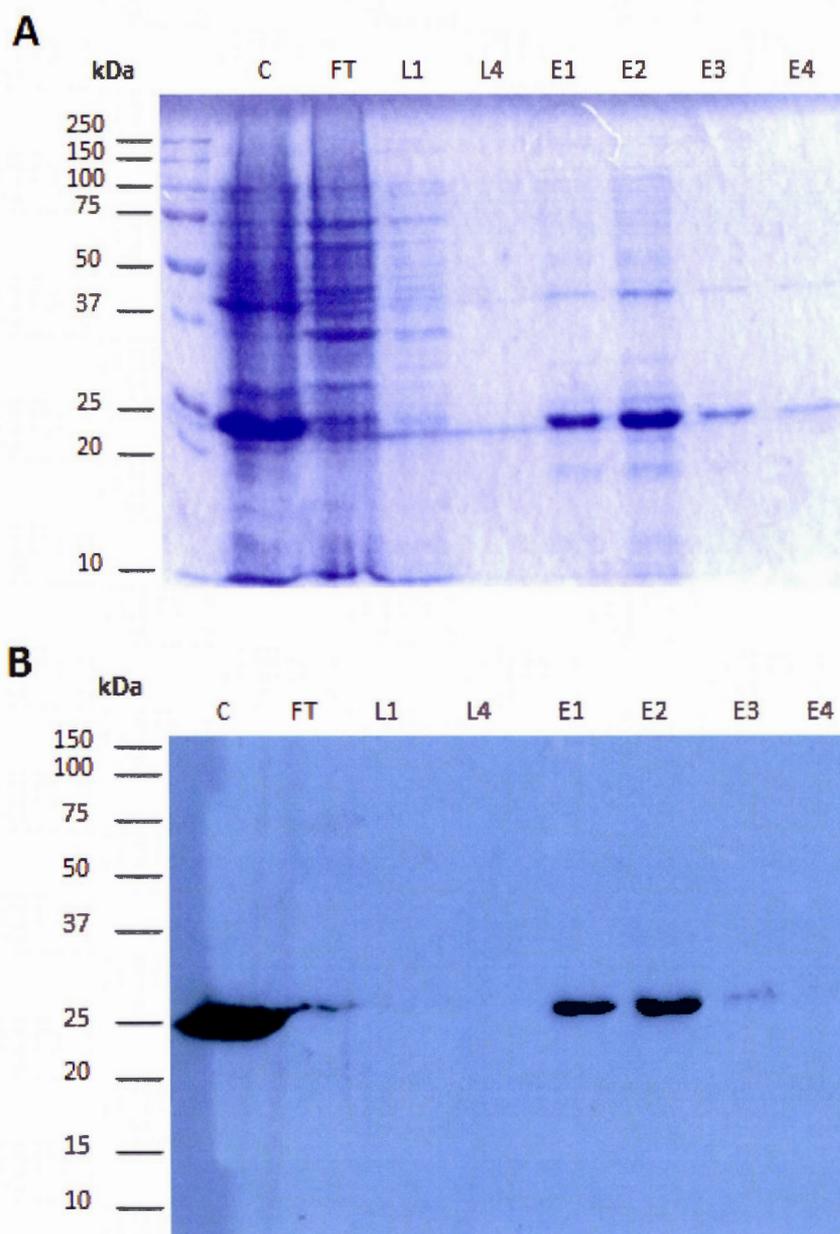


Figure 3.2 Purification de la protéine Rev WT sur colonne Histidine. Étapes de purification de la protéine Rev WT du VIB; C : culot, FT : fraction non-retenue, L : lavage et E : élution. (A) Gel d'acrylamide 12% avec SDS coloré au bleu de Coomassie. (B) Confirmation de la présence de la protéine par Western Blot en utilisant un anticorps anti-His₆.

3.2 Vérification de la purification des protéines

Suite à la purification, les protéines ont été déposées sur un gel dénaturant afin d'observer leur présence et leur pureté. Toutes les protéines ont pu être produites et purifiées sur colonne comme le montre la Figure 12.

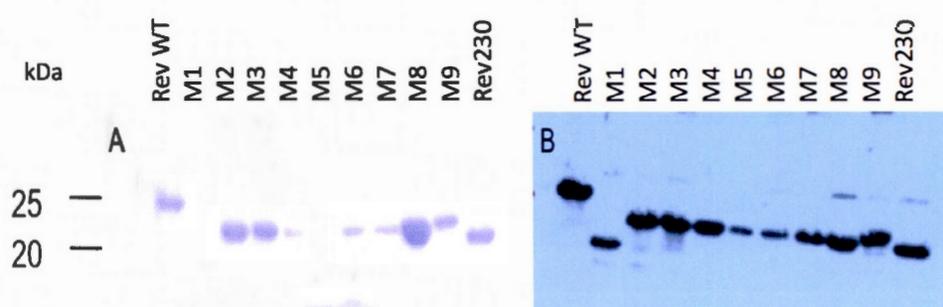


Figure 3.3 Protéines Rev du VIB (WT à M9) et du VIH-1 (Rev230) purifiées. Cinq microgrammes de protéines purifiées ont été déposées sur un SDS-PAGE 12,5% (A) coloré au bleu de Coomassie et (B) suite au Western Blot et marquage avec un anticorps anti-His.

Très peu de bandes non spécifiques ont été observées ce qui signifie que les protéines étaient suffisamment purifiées pour obtenir des résultats fiables. La concentration en protéines était généralement située entre 0,5 et 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ selon les mutants.

3.3 Essai de multimérisation *in vitro*

Le test de multimérisation avec le glutaraldéhyde a été effectué avec la Rev WT du VIB de même que la Rev WT du VIH-1 (Rev230) ainsi qu'avec tous les mutants Rev du VIB. Les résultats du Western blot à la Figure 13 montrent que les formes monomériques et dimériques de la protéine Rev étaient présentes pour tous les mutants. De plus, la concentration de la forme dimérique augmentait dans le temps avec l'apparition de bandes de tailles supérieures montrant les multimères. Pour les

mutants M4 et M6, les bandes après 15 minutes semblaient moins intenses que pour les autres mutants. Toutefois, la forme dominante de la protéine Rev après 15 minutes d'incubation était celle de monomères de grande taille. Pour les mutants M1 ($\Delta 1-30$) et M5 ($\Delta 91-110$) les résultats furent différents. Pour le mutant M1, seuls des monomères et des dimères furent observés. Pour le mutant M5, des trimères et des formes supérieures semblent être présentes après deux minutes d'incubation. Cependant, les formes monomériques et dimériques étaient dominantes après 15 minutes d'incubation contrairement aux autres mutants. La multimérisation semblait donc moins efficace pour ce mutant ainsi que pour M1. Les résultats suggèrent que les deux régions délétées dans ces mutants forment les domaines de multimérisation. Un marquage avec l'anticorps anti-Rev a donné les mêmes résultats (données non montrées). Le test a été fait avec différentes concentrations de la protéine Rev afin de s'assurer que la réaction n'était pas simplement due à une forte concentration de protéines. Une concentration dix fois plus élevée en GA n'a pas non plus affecté la formation des oligomères (données non montrées).

3.4 Immunofluorescence

Suite aux résultats précédents, une technique *in vivo* permettant d'observer l'interaction entre deux protéines tel que décrit dans la section 2.7.3. a été utilisée. Dans un premier temps, afin de vérifier l'efficacité de transfection des vecteurs BiFC et le niveau d'expression de la protéine Rev, un essai d'immunofluorescence a été effectué. Les résultats ont montré une efficacité de transfection de chacun des vecteurs d'environ 50% alors que l'efficacité de co-transfection (cellules HEK 293T transfectées par les deux vecteurs) était d'environ 40% (Figure 14).

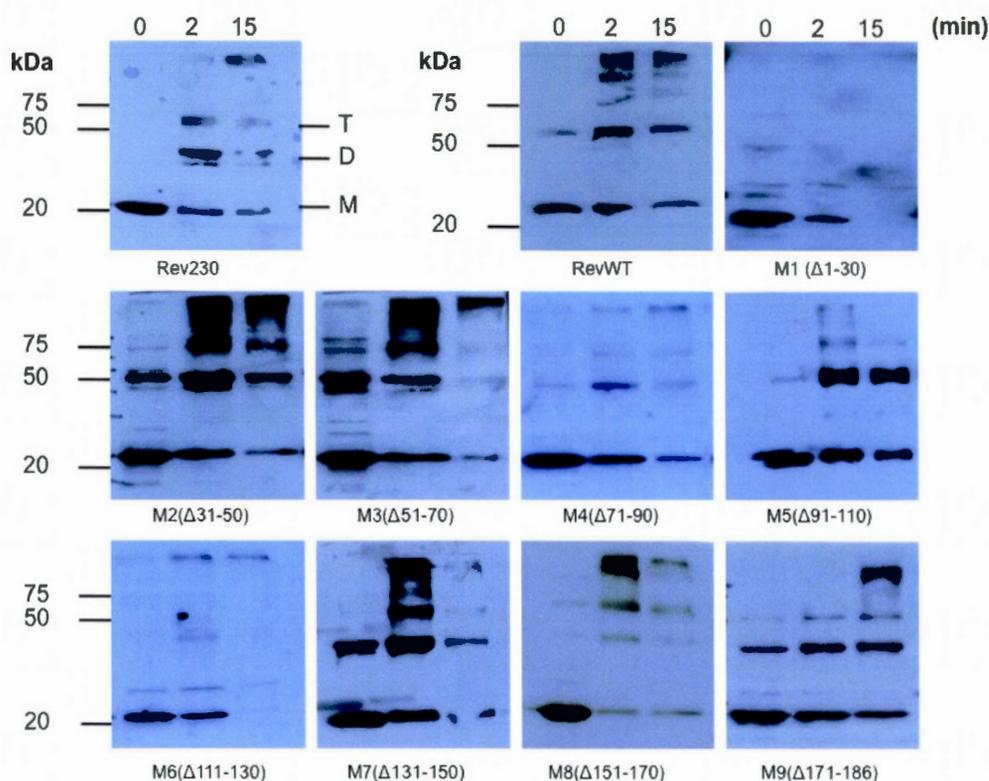
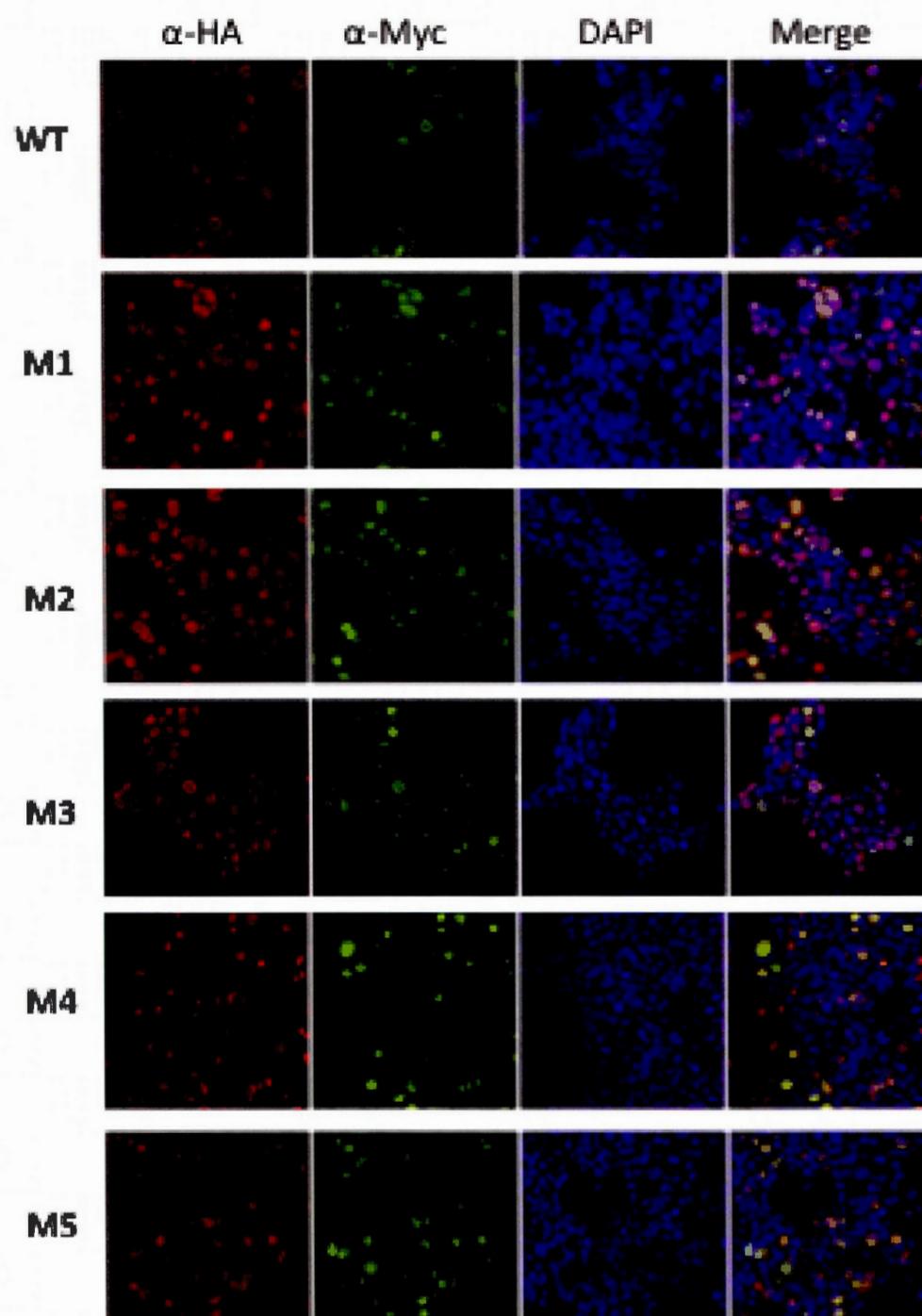


Figure 3.4 Essai de multimérisation *in vitro*. Cinq μg de protéines purifiées n'ont pas été traités ou ont été incubés avec du glutaraldéhyde (GA) 0,002% pour 2 ou 15 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée et le tampon de chargement a été ajouté. Les échantillons ont été dénaturés et déposés sur un SDS-PAGE 12,5%. Un Western Blot a ensuite été effectué avec un anticorps anti-His. *M*: monomères, *D*: dimères et *T*: trimères.

3.5 Essai de multimérisation en culture cellulaire par la technique du BiFC

Les essais de BiFC en temps réel ont montré qu'un signal était détecté à partir de 8 h après la transfection pour le VIH-1 alors que pour le VIB, le signal a été détecté environ 12 h après la transfection. Le signal a augmenté tout au long de la prise de données et semblait se stabiliser près de 24 h après la transfection (données non montrées). Pour les autres essais, les cellules ont donc été fixées 24 h suivant la transfection.



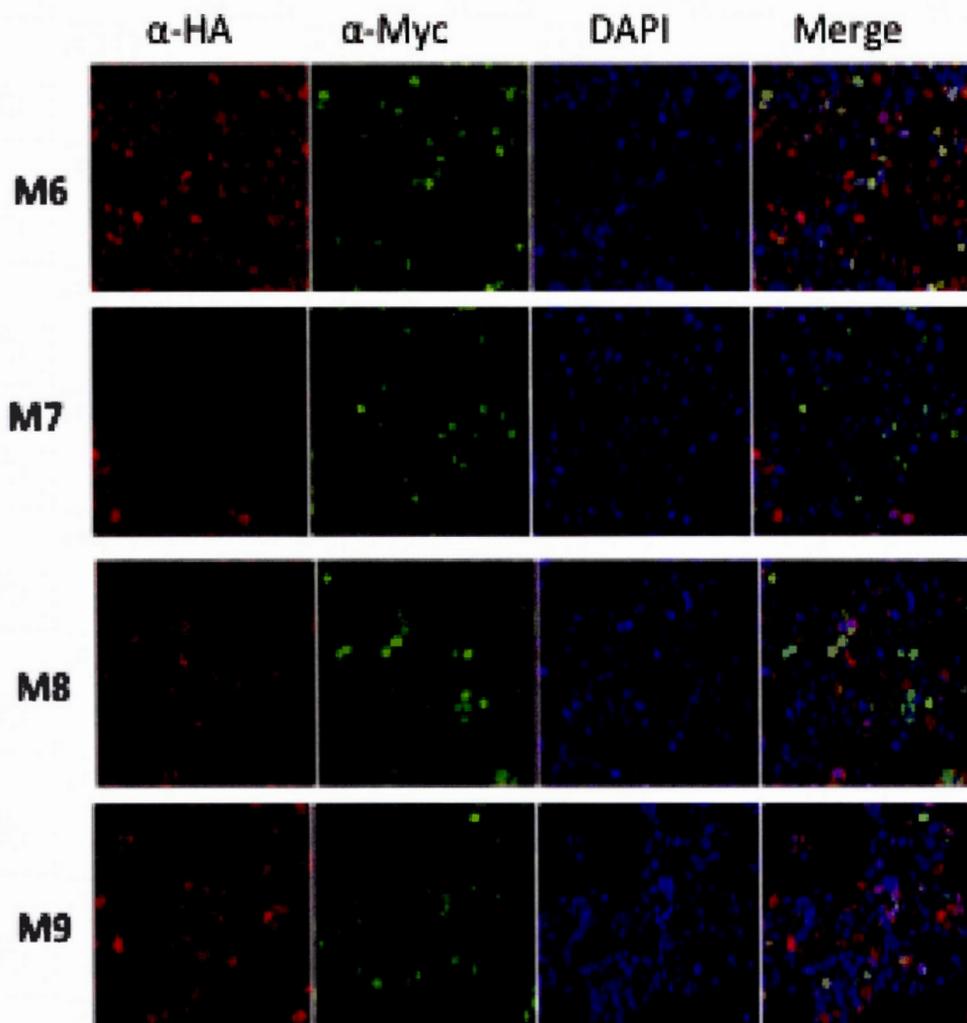


Figure 3.5 Efficacité de transfection des vecteurs de fluorescence par complémentation estimée par immunofluorescence. Analyse en microscopie de fluorescence des protéines Rev portant l'étiquette moléculaire HA (rouge) ou Myc (vert) exprimées dans des cellules HEK 293T 24 h après transfection. Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Les images montrées sont représentatives du patron d'expression observé dans trois expériences indépendantes. L'étiquette HA provient du vecteur VC155 et Myc du vecteur VN155 (I52L).

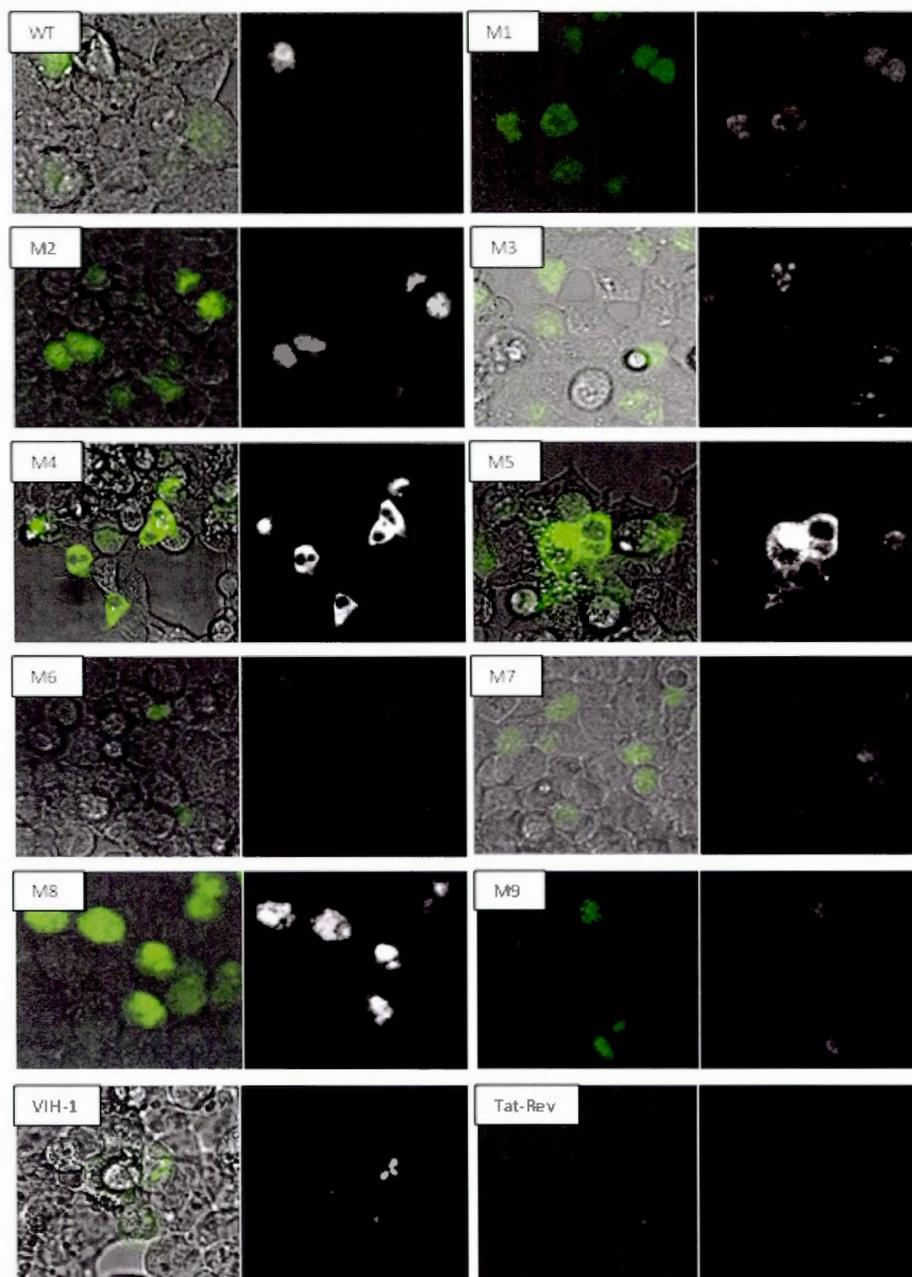


Figure 3.6 Localisation cellulaire de la protéine Rev du VIB par BiFC. Analyse en microscopie de fluorescence des protéines Rev formant des dimères (vert) exprimées dans des cellules HEK 293T 24 h après transfection. Les images montrées sont représentatives du patron d'expression observé dans plus de 80% des cellules de trois expériences indépendantes. La protéine Tat et la protéine Rev sont connues pour ne pas interagir ensemble et ont donc servies de contrôle négatif. Le panneau de gauche

montre les cellules en contraste de phase avec la fluorescence en vert. Le panneau de droite montre la fluorescence seulement en noir et blanc pour accentuer le contraste.

L'essai de fluorescence par complémentation (BiFC) a confirmé la localisation de la protéine Rev observée suite à l'immunofluorescence dans les cellules (Figure 15). De plus, un signal a pu être détecté pour tous les mutants. Ces deux conditions remplies, le test du BiFC a donc pu être utilisé. L'efficacité de formation du complexe BiFC est déterminée par le taux d'association des fragments et non par la stabilité du complexe (Kerppola, 2009). L'intensité de la fluorescence après un temps donné est donc un bon moyen d'évaluer l'efficacité des mutants à former des dimères. Pour déterminer si un ou des mutants étaient moins efficaces pour former un complexe, l'intensité de fluorescence a été mesurée en utilisant des paramètres fixes lors de la prise de données (Figure 16). Les résultats ont montré que pour les mutants M1 et M5 ($p=0,03$), même si un signal de fluorescence a été détecté, celui-ci dépassait à peine la valeur du témoin négatif (la protéine Tat du VIB en association avec la protéine Rev du VIB qui ne forment pas de multimère tel que rapporté pour le VIH-1) (Daelemans *et al.*, 2004). L'association de M1 avec M5 a aussi donné un résultat très faible ($p=0,03$). La détection d'un signal très faible est possible à cause de la sensibilité élevée à détecter la fluorescence et le bruit de fond minimal de la plupart des cellules (Kerppola, 2009). Outre ces mutants, les mutants M3 et M4 ont montré une baisse de l'intensité de fluorescence par rapport à la protéine Rev sauvage (WT) bien que le signal était supérieur au témoin négatif. Seule l'intensité de fluorescence moyenne du mutant M4 était significative ($p=0,032$). Au contraire, la protéine Rev du VIH-1 a montré la plus forte intensité lors de tous les essais. Un essai de multimérisation en temps réel sur des cellules vivantes a montré que la protéine Rev du VIH-1 émet un signal de fluorescence dans un temps plus court que pour la Rev du VIB ce qui expliquerait le signal plus intense (données non montrées). Sur la Figure 15, les mutants M4 et M5 semblaient très efficaces pour la multimérisation de par la forte intensité du signal illustré. Cependant, en ne modifiant pas l'intensité des lasers lors

de la prise de données, le signal pour ces mutants s'est avéré très faible comme le montre le graphique de la Figure 16. Les figures ayant servi à calculer l'intensité de fluorescence ne sont pas montrées puisque le signal n'était pas visible sur la plupart des photos et qu'il est difficile d'évaluer la différence d'intensité à l'œil.

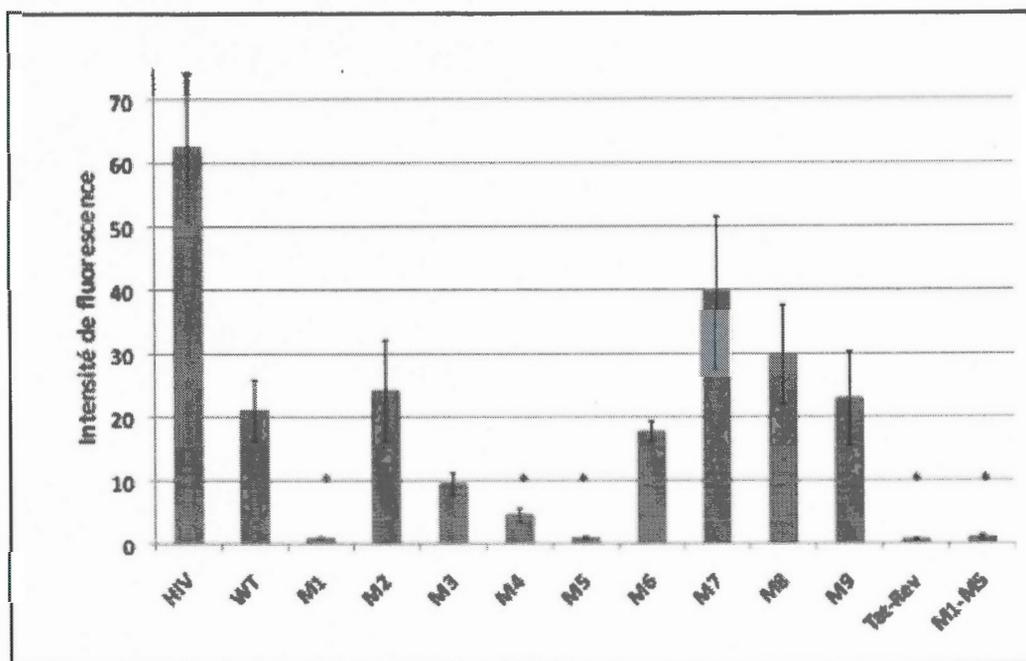


Figure 3.7 Intensité de la fluorescence moyenne des protéines Rev suite au BiFC. Analyse en microscopie à fluorescence des protéines Rev formant des dimères exprimées dans des cellules HEK 293T 24 h après transfection. L'intensité de fluorescence a été calculée pour une dizaine de cellules par photo avec le programme Image J. Le bruit de fond a été soustrait à la moyenne. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type et l'astérisque (*) indique que la valeur est significativement différente de celle obtenue pour la protéine Rev WT du VIB suite à un test de t bilatéral ($p < 0,05$). L'expérience a été répétée trois fois avec des résultats similaires.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les protéines Rev et Rev-like des rétrovirus complexes sont des protéines régulatrices essentielles pour la réplication virale. Elles dirigent l'exportation nucléaire des ARN viraux partiellement et non épissés. Afin d'exercer leur activité, les protéines Rev des lentivirus doivent former des oligomères (Zapp *et al.*, 1991 ; Olsen *et al.*, 1990 ; Madore *et al.*, 1994 ; Jain and Belasco, 2001 ; Hoffman *et al.*, 2012 ; Daelemans *et al.*, 2012). La présente étude est la première à utiliser la technique du BiFC pour caractériser le domaine de multimérisation d'une protéine Rev des lentivirus.

Multimérisation *in vitro* avec GA

Pour les autres protéines Rev caractérisées, les techniques employées pour cibler les domaines de multimérisation étaient majoritairement *in vitro*. Ces méthodes utilisent le glutaraldéhyde (GA) ou le diméthyl sulfate (DMS), des agents réticulants, pour fixer les interactions entre les protéines (Zapp *et al.*, 1991). Pour étudier la multimérisation en présence du RRE, la technique de retardement sur gel a été utilisée avec une sonde radioactive pour marquer le RRE (Madore *et al.*, 1994 ; Olsen *et al.*, 1990 ; Jain and Belasco, 2001). Cependant, si l'on désire éviter d'utiliser de la radioactivité, le test avec le GA est plus approprié. De plus, la protéine Rev n'a pas besoin du RRE pour multimériser (Hoffman *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus avec le test de multimérisation *in vitro* sont le fruit de plusieurs essais indépendants. En effet, la purification doit être assez efficace pour avoir un degré satisfaisant de pureté pour la protéine. Autrement, des interactions entre Rev et

d'autres protéines présentes dans l'échantillon pourraient biaiser les données. Pour le mutant M1, aucune forme supérieure à un dimère n'a été observée. Pour le mutant M5, il semble y avoir des bandes correspondant à des formes supérieures à un dimère. Cependant, après 15 minutes de réaction, la forme dimérique est très dominante et il n'y a pas de forme supérieure. Bien entendu, ces résultats ne permettaient pas à eux seuls de confirmer que le domaine de multimérisation était bel et bien formé des régions absentes dans ces deux mutants. Pour confirmer les résultats obtenus, un deuxième test a été utilisé, soit la fluorescence bi-moléculaire par complémentation ou BiFC.

Multimérisation et BiFC

Dans des cellules vivantes, seule la technique du FRET avait été utilisée pour la Rev du VIH-1 (Hoffman *et al.*, 2012 ; Daelemans *et al.*, 2004). Un test basé sur le gène rapporteur CAT peut aussi être utilisé pour cibler les mutants qui ne peuvent pas former des dimères en considérant qu'un monomère seul n'est pas fonctionnel. Ce test mesure l'activité de Rev, soit sa capacité à faire passer des transcrits du noyau vers le cytoplasme, et sert préférentiellement à identifier les autres domaines fonctionnels tels que le NES et le NLS (Hoffman *et al.*, 2012). Les résultats pour le BiFC doivent être interprétés de la façon la plus convenable possible afin d'avoir des résultats significatifs. Si l'intensité de fluorescence avait été mesurée pour la cellule totale, les mutants M4, M5 et M6 qui ne peuvent se localiser dans toute la cellule auraient faussé les données. Comme Rev multimérise principalement dans le noyau (Daelemans *et al.*, 2004), l'intensité de fluorescence a été mesurée dans ce compartiment pour tous les mutants sauf pour M4 et M5 où la fluorescence a été mesurée dans le cytoplasme.

Selon les résultats, les mutants M1, M4, M5, M1-M5 et le témoin négatif Tat-Rev ont montré une intensité de fluorescence significativement inférieure à la protéine Rev

WT. Le faible signal détecté pour M4 est probablement dû à sa localisation cytoplasmique. Il a été montré pour le VIH-1 par la technique de FRET que la protéine Rev peut former des multimères dans le cytoplasme mais que la fréquence est significativement inférieure à celle observée dans le nucléole où l'interaction y est très forte. Ces résultats soutiennent l'idée que le nucléole joue un rôle important dans le transport nucléocytoplasmique (Daelemans *et al.*, 2004). Le mutant M5 est aussi localisé dans le cytoplasme ce qui aurait pu expliquer sa très faible capacité à former des multimères. Cependant, le test *in vitro* avait aussi identifié ce mutant comme déficient pour la multimérisation.

Le mutant 3 a aussi montré une capacité à former des dimères inférieure, bien que non significative ($p=0,06$), à celle de la protéine Rev sauvage à former des dimères. Comme le mutant 3 n'est pas déficient pour un domaine fonctionnel connu, il est permis de croire que cette mutation entraîne un changement important dans la conformation de la protéine qui rend les domaines de multimérisation moins efficaces. En se référant à la structure de la protéine Rev obtenue par cristallisation (Figure 6), la séquence absente chez le mutant 3 pourrait représenter la région charnière donnant au domaine N-terminal de la protéine une forme d'épingle à cheveux. Un raccourcissement de cette région pourrait alors déformer la protéine ou éloigner les domaines de multimérisation l'un de l'autre. Selon le modèle de dimérisation présenté par DiMattia *et al.* (2010) (Figure 6), l'éloignement des deux domaines pourrait nuire à l'interaction entre les protéines Rev.

Les mutants M1 et M5 possèdent tous deux une séquence riche en acides aminés hydrophobes. Pour le VIH-1, ce sont principalement des leucines et des isoleucines qui forment le domaine de multimérisation ainsi qu'une valine et une alanine. Pour chaque domaine, il y a 4 résidus clés (Jain and Belasco, 2001). Pour le VIB, il y a plusieurs résidus leucines et isoleucines dans la région C-terminale de la séquence déletée des deux mutants ciblés. Pour M1, les aa les plus susceptibles de former le

domaine de multimérisation seraient L20, L21, I25 et L30. Pour M5, les aa seraient L102, L105 et I109. Cette organisation ressemblerait beaucoup à celle du VIH-1. Pour les autres mutants, les séquences auraient un rôle structural plutôt que fonctionnel (Heger *et al.*, 1998) (Appendice B).

L'activité de la protéine Rev peut être mesurée par un ELISA avec le gène rapporteur CAT (Roche). Ce test mesure l'efficacité d'exportation nucléaire de Rev. Pour le mutant M1, l'activité mesurée dans une précédente étude (Gomez Corredor and Archambault, 2009) était similaire à celle de la protéine Rev WT. Par conséquent, cela signifie que le mutant M1 peut se lier au RRE sous forme de dimère puisque minimalement deux molécules sont nécessaires pour que Rev puisse accomplir sa fonction d'exportation. Pour les mutants M4, M5 et M6, l'activité était significativement inférieure à Rev WT puisque ces mutants ne portent pas les signaux de localisation et d'exportation nucléaire respectivement (Gomez Corredor et Archambault, 2009 ; 2012). Ils ne peuvent donc pas entrer ou sortir du noyau d'où leur faible activité dans les essais CAT. Pour déterminer l'impact de la délétion du domaine de multimérisation contenu dans le mutant M5, il faudrait produire un clone pour lequel seuls les acides aminés 102 à 110 seraient délétés (séquence riche en résidus hydrophobes). Ainsi, le NLS et le NoLS seraient présents et la distribution de la protéine n'affecterait plus sa capacité à former des multimères. En se référant au modèle de Jain et Belasco (2001), un premier monomère de Rev doit se fixer au RRE dans une orientation donnée. Un deuxième monomère peut alors se lier au RRE et former un dimère avec le premier monomère. Considérant que le mutant M1 peut former ce dimère et exercer sa fonction d'exportation, on peut supposer que le mutant M5 fixé au RRE présentera la surface mutée et que par conséquent, aucun dimère ne pourra être formé sur le RRE (Figure 17). L'activité d'exportation de Rev devrait donc être très faible et peut-être même nulle. Chez le VIH-1, c'est aussi le deuxième domaine de multimérisation, à la droite du NLS, qui bloque la formation de dimère sur le RRE (Hoffman *et al.*, 2012).

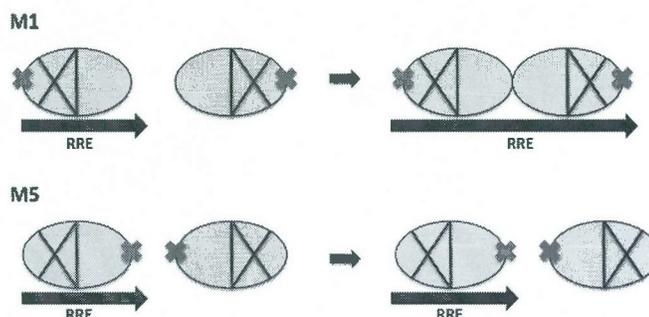


Figure 4.1 Modèle d'interaction des mutants M1 et M5 de la protéine Rev du VIB sur le RRE

En ce qui concerne l'analyse des données, l'observation au microscope ne permet malheureusement pas d'observer toutes les cellules dans chaque essai ce qui peut affecter la justesse des données. Il existe d'autres essais qui peuvent être effectués avec le BiFC. Une mesure de la fluorescence des cellules vivantes dans une plaque 96 puits aurait pu être faite à l'aide d'un lecteur de plaque adéquat. Le problème avec cette méthode est que le test ne prend pas en considération le pourcentage de cellules positives par rapport aux cellules totales. Donc, si pour un mutant l'efficacité de transfection est légèrement différente des autres, cela pourrait affecter l'intensité de la fluorescence et encore une fois fausser les données. Les cellules transfectées pourraient aussi être passées au cytofluoromètre qui peut séparer les cellules fluorescentes des cellules non fluorescentes et mesurer l'intensité de fluorescence moyenne. Cette méthode est simple, efficace et rapide. Par contre, elle ne permet pas d'observer la localisation de la protéine.

Avantages de la technique du BiFC

Plusieurs protéines ont des fonctions qui dépendent de leur contexte cellulaire. Comme les interactions avec différents partenaires peuvent avoir lieu dans différents compartiments cellulaires, la détermination de l'endroit où se trouve un complexe

contenant la protéine peut fournir des indices sur son rôle fonctionnel et sa régulation. L'étude dans des cellules intactes permet aussi d'éviter des changements dans l'interaction entre les protéines qui peut avoir lieu après la lyse cellulaire et le mélange des différents compartiments cellulaires. Pour ces raisons, il est préférable de visualiser les interactions directement dans les cellules vivantes. Dans ce but, plusieurs méthodes ont été développées, mais requièrent une instrumentation élaborée et une analyse complexe des données ou encore un marquage des cellules avec des fluorophores exogènes ou des marqueurs moléculaires.

Le test BiFC a été développé afin de permettre une visualisation simple et directe des interactions protéiques dans des cellules vivantes (Hu *et al.* 2002). Cette approche permet aussi la visualisation de la localisation cellulaire des interactions protéiques spécifiques dans un environnement normal. La technique du BiFC peut être utilisée pour analyser l'interaction entre plusieurs types de protéines et ne requiert aucune information concernant la structure des partenaires d'interaction. Un simple microscope à épifluorescence est nécessaire et aucun marquage n'est requis. Un des avantages du BiFC par rapport aux autres techniques de complémentation, est que la protéine de fluorescence reconstituée possède une forte fluorescence intrinsèque permettant ainsi une visualisation directe du complexe protéique (Hu and Kerppola, 2003). De plus, les cellules vivantes peuvent être observées durant de longues périodes et le peu de manipulation réduit le risque d'altération des résultats. Une distribution inégale des substrats chromogéniques ou fluorogéniques ou encore des ligands est aussi évitée. En somme, le BiFC permet la visualisation directe des interactions protéiques et ne dépend pas d'effets secondaires. De plus, les protéines sont exprimées dans un contexte biologique pertinent et idéalement à des niveaux comparables à leurs homologues endogènes. Cela permet de refléter les propriétés des protéines natives incluant les modifications post-traductionnelles. Un test découlant du BiFC utilisé dans cette étude est le BiFC multicolore. Une analyse BiFC multicolore permet la visualisation simultanée de plusieurs complexes protéiques

dans une même cellule ainsi que l'analyse de la compétition entre des partenaires d'interaction alternatifs pour la formation d'un complexe.

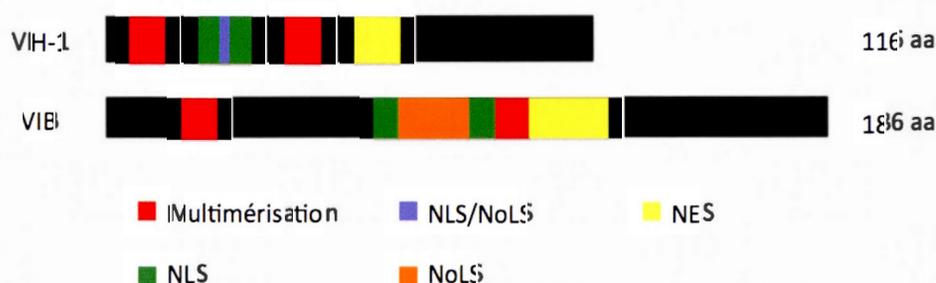
Par contre, une des limitations du BiFC est le temps requis pour la maturation du fluorophore prévenant la détection en temps réel de changements rapides au niveau des interactions. Aussi, la formation du complexe bimoléculaire fluorescent est irréversible *in vitro*. Ces caractéristiques limitent l'utilisation du BiFC pour étudier l'efficacité de formation de complexes protéiques sur de longues périodes de temps (plusieurs heures).

Parmi les autres méthodes développée pour étudier les interactions protéiques dans les cellules, le transfert d'énergie par résonance de type Förster ("Förster resonance energy transfer" ou FRET) est une méthodes très utilisée (Piston and Kremers, 2007). Cette technique est basée sur l'utilisation de deux fluorophores, tous deux chimiquement liés ou génétiquement fusionnés à deux protéines dont l'interaction est à déterminer. En comparaison au BiFC, le FRET nécessite un niveau d'expression des protéines plus élevé pour une détection fiable du transfert d'énergie. De plus, il est nécessaire d'avoir des informations sur la structure des protéines ou beaucoup de chance pour placer les fluorophores à moins de 100 Å l'un de l'autre. Il s'agit de la distance maximum entre les protéines fluorescentes permettant la détection du transfert d'énergie. De nombreux contrôles doivent être utilisés pour exclure des interprétations alternatives et la fluorescence doit être mesurée avec beaucoup de précision. Un avantage du FRET par rapport au BiFC est la réversibilité de la formation d'un complexe, ce qui permet l'analyse de l'interaction en conditions d'équilibre. FRET est donc plus approprié pour l'étude des cinétiques d'association et de dissociation des protéines. L'intensité de la fluorescence du BiFC ne permet pas d'évaluer la dynamique des interactions entre les protéines pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il y a un délai entre la dimérisation de Rev et l'apparition de la fluorescence dû au temps requis pour l'association des fragments de la protéine de

fluorescence et les réactions chimiques produisant le fluorophore. Cependant, ce temps de délai est mesurable en minutes. Le signal augmente ensuite durant plusieurs heures. Finalement, le complexe BiFC augmente la stabilité de l'interaction de la protéine Rev par l'interaction entre les deux fragments de la protéine Vénus (Kerppola, 2009).

Organisation des domaines fonctionnels et perspectives

Suite aux tests effectués, il est intéressant de comparer la localisation des différents domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIH-1 et du VIB. Bien que leur composition en acides aminés soit différente et que le NoLS du VIH-1 soit indissociable du NLS, la disposition des domaines fonctionnels est semblable pour les deux virus. Par conséquent, la structure tridimensionnelle de Rev du VIB (qui n'a pas encore été déterminée) devrait ressembler à celle du VIH-1 avec une région charnière plus longue.



Afin de mieux caractériser le domaine de multimérisation, des mutants de substitution pourraient être générés par PCR en remplaçant les leucines et les isoleucines des séquences formant le domaine de multimérisation par des sérines (Jain and Belasco, 2001). Ces acides aminés sont ciblés puisque les domaines de multimérisation sont

formés de résidus hydrophobes. Ils seraient donc remplacés par un résidu polaire (hydrophile) tel qu'une sérine (Jain et Belasco, 2001) afin d'évaluer leur importance dans la formation d'oligomères.

Il est maintenant connu que Rev peut former des oligomères en absence du RRE et que la protéine peut aussi se lier au RRE sans former d'oligomère. Bien que ces deux évènements soient indépendants l'un de l'autre, il n'est pas clair si la présence du RRE affecte l'efficacité de multimérisation (Hoffman *et al.*, 2012). En utilisant la technique du BiFC, il serait possible de répondre à cette question. Il suffit de transfecter des cellules avec les vecteurs BiFC codant pour la protéine Rev WT dans la moitié des puits et d'effectuer une cotransfection avec les vecteurs BiFC ainsi que le vecteur pDM138 codant pour le RRE du VIB (disponible au laboratoire). Si une augmentation de la fluorescence est observée pour le traitement avec le RRE, cela signifie que le RRE favorise la formation d'oligomère et vice versa.

Finalement, avec les résultats obtenus, il serait intéressant de produire un clone infectieux dont le domaine de multimérisation (ou un des domaines) a été délété et de regarder l'impact de cette délétion sur la rélication virale du VIB en utilisant des cellules permissives au virus (BOMAC). Cela permettrait d'évaluer l'importance de la multimérisation sur le cycle viral et de possiblement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

CONCLUSION

La protéine Rev des lentivirus joue un rôle clé dans la réplication du virus. Cependant, elle doit pouvoir former au minimum un homodimère pour assurer son rôle. Ce travail avait donc pour objectif principal de localiser le domaine de multimérisation responsable de la formation d'oligomères.

Des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire avaient montré que la protéine Rev du VIB, comme celle du VIH-1, pouvait former des dimères *in vivo* (voir Annexe B). Ces résultats ont été confirmés dans la présente étude via la fluorescence bi-moléculaire par complémentation.

Cette étude a montré que le domaine de multimérisation du VIB est situé entre les aa 1 à 30 et 91 à 110. Ce dernier ressemble beaucoup au domaine du VIH-1 de par sa structure mais pas par sa composition en acides aminés. Cette étude a aussi montré qu'il est possible d'étudier la multimérisation en culture cellulaire avec le BiFC. Cette technique est simple et rapide, mais ne peut à elle seule identifier avec certitude les domaines de multimérisation puisqu'elle est affectée par la localisation de la protéine. Ces tests devront être répétés avec des mutants de substitution afin de cibler les acides aminés clés pour la multimérisation.

ANNEXE A : Préparation de la matrice de terre de diatomée pour la mini extraction d'ADN

Pour préparer cette solution, 2 g de terre de diatomée ont été mélangé avec 40 mL de ddH₂O dans un tube de 50 mL. La solution a été laissée deux heures au réfrigérateur pour décanter. Le surnageant a ensuite été aspirer pour retirer les particules fines. À nouveau, 40 mL de ddH₂O ont été ajoutés et les étapes ont été répétées deux fois au total. La solution a ensuite été conservée à 4°C.

ANNEXE B : Résultats préliminaires montrant que la protéine Rev peut former des dimères dans les cellules.

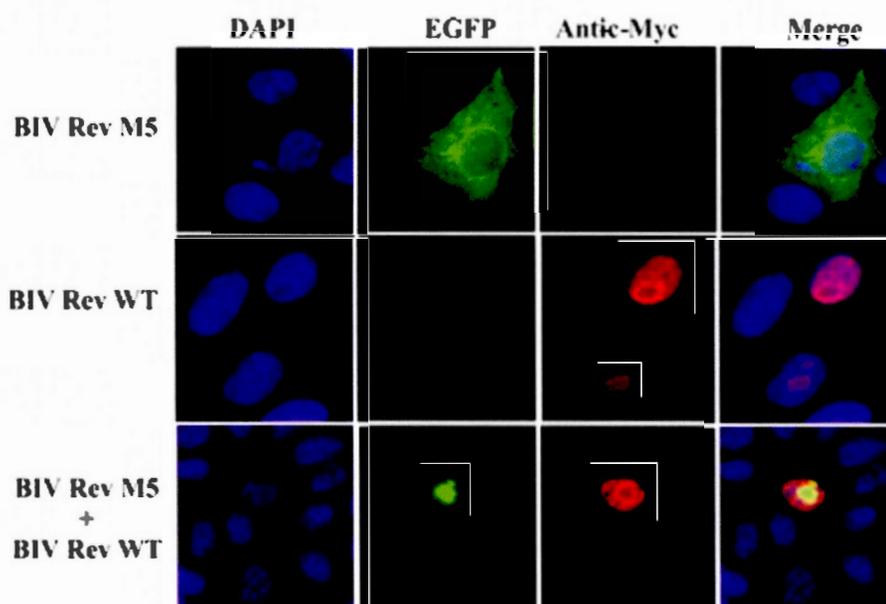


Figure 5.1 Multimérisation *in vivo* de la protéine Rev du VIB. Des cellules Cf2Th ont été cultivées dans des plaques de 6 puits et transfectées avec les vecteurs pEGFP Rev M5 et pcDNA3.1Myc/His BIV Rev WT. Après 24 h suivant la transfection, les cellules ont été fixées et une immunofluorescence a été effectuée en utilisant un anticorps monoclonal anti-Myc et un second anticorps couplé à la molécule fluorescente Cy3. Le noyau a été marqué au DAPI.

APPENDICE A: Description des plamides

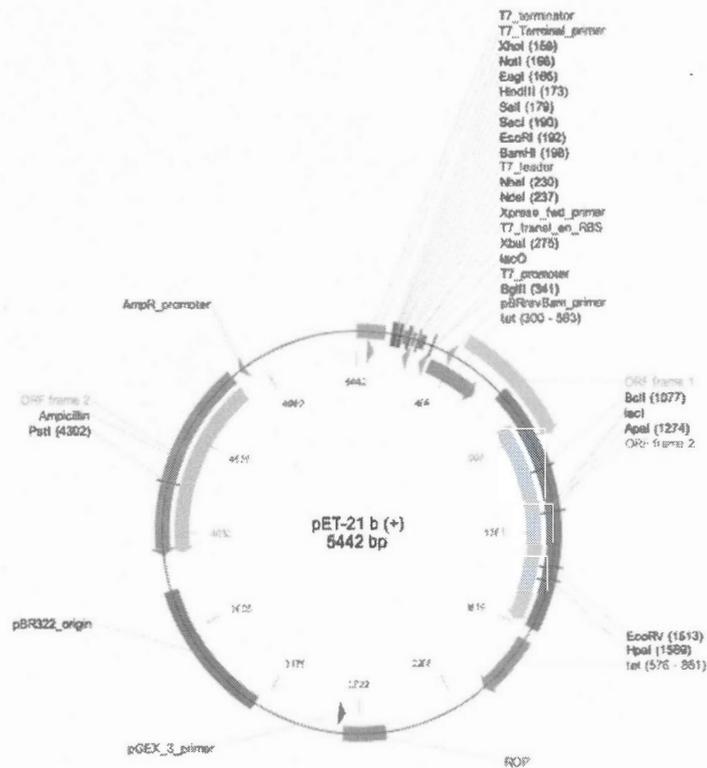


Figure 5.2 Schématisation du vecteur pET-21b(+) utilisé pour produire la protéine Rev. L'insertion de l'ADNc dans ce vecteur entre les sites EcoRI et XhoI a permis d'ajouter une étiquette 6-Histidine à l'extrémité C-terminale des protéines Rev.

APPENDICE A (suite)

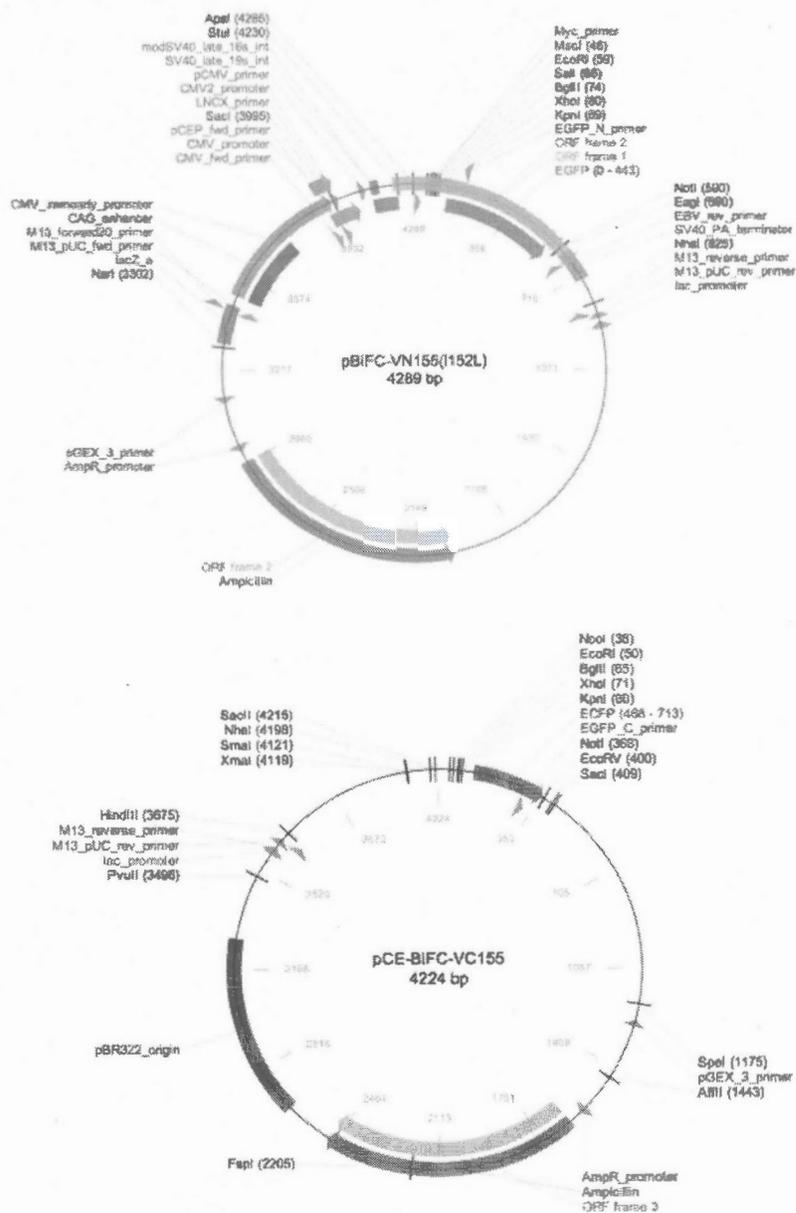


Figure 5.3 Schématisation des vecteurs de fluorescence par complémentation utilisés pour l'essai de multimérisation en culture cellulaire. Le gène de Rev a été inséré entre les site EcoRI et XhoI. Le vecteur VC155 ajoute une étiquette hémagglutinine (HA) et l'extrémité C-terminale de la protéine de fluorescence Vénus à la protéine Rev. Le vecteur VN155 (I152L) ajoute une étiquette Myc et l'extrémité N-terminale de la protéine Vénus à la protéine Rev. La mutation I152L dans ce vecteur réduit le bruit de fond en réduisant l'association spontanée entre les deux extrémités de Vénus.

APPENDICE B : Séquence Rev BIV et ses domaines fonctionnels (Genbank : L04973.1)

```

ATGGATCAGGACCTAGACCGCGCGGAACCGCGGGAAAGGGAAGGAGGATCCGAAGAAGT
M D Q D L D G A E R G E R G Q Q S E E L

CTTCAGGAGAAGATCAACGAAGGGAGGCTGACAGCCAGAGAAGCTTTACAACATGGATC
L Q E E I N E G R L T A R E A L Q T W I

AATAACGATTCTCCTAGGTATGTTAAGAAGCTGCGCCAAGGTCAGCCAAAATTACCAACA
N N D S P R Y V K K L R Q G Q P E L P T

TCTCCCGACGGAGGAGGAGGACGGGGACACAGAGCCAGAAAGCTCCCCGGCGAGAGGAGA
S P G G G G R G H R A R K L P G E R R

CCCCGCTTCTGGAAGTCTCTACGAGAATTGGTTGAACAAAATAGGAGAAAGCAAGAACGA
P G F W K S L R E L V E Q N R R K Q E R

CGCCTATCGGGTCTGGACAGAAGAATACACAGCTTAAAGATCTTGTTCGCCACATGTCG
R L S G L D R R I Q Q L E D L V R H M S

CTGGGATCTCCTGACCCCTCAACTCCTTCAGCTTCCGTTCTTCTGTAAACCCTCCTGCT
L G S P D P S T P S A S V L S V N P P A

CAAACCTCCTTTGGGACATCTTCCGCCAGGCTCCTATTTTAAACTTAAAAGGGTGGACTGT
Q T P L G H L P P R S Y F K L K R V D C

GGGGCAGGGTGGGACCTCAGGACAACAGCAGCCCCGGACTTCCCATATGTGAATTGGAC
G A G W D L R T T A A P G L P I C E L D

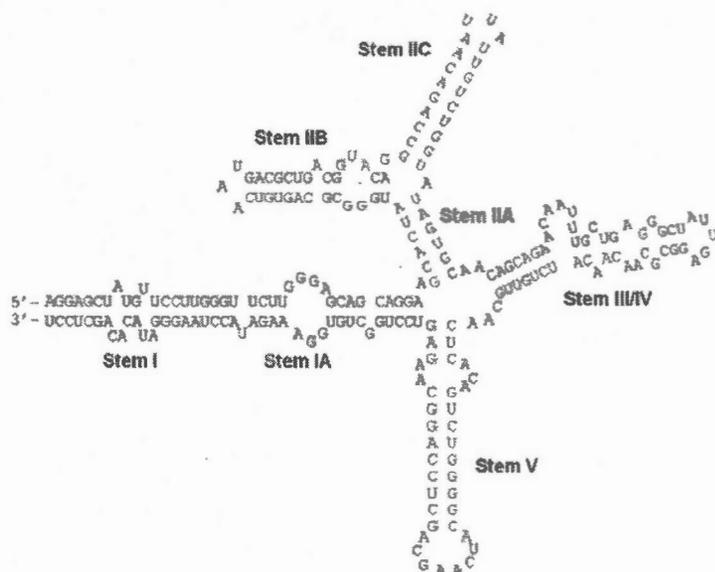
TGGATCCAGGGAACAAAA
W T Q G T K

```

Figure 5.4 Séquence de la protéine Rev(souche R-29) du VIB et ses domaines fonctionnels connus. Les acides aminés composant les domaines de multimérisation sont en gras. Les acides aminés composant le NLS sont soulignés, ceux composant le NoLS sont en rouge et ceux composant le NES sont en italique.

APPENDICE C : Modèle d'assemblage de Rev sur le RRE

A



B

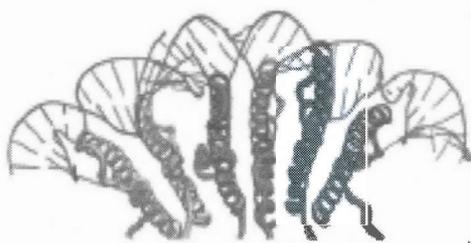


Figure 5.5 Structure du RRE du VIH-1 et liaison de Rev. A) Structure secondaire prédite du RRE du VIH-1. Le domaine Stem IIB du RRE est le premier site de liaison de haute affinité caractérisé pour Rev. Il est nécessaire à la fonction de Rev, mais pas suffisant. Une seconde protéine doit lier le domaine Stem IA du RRE. B) Modèle d'assemblage des protéines Rev sur le RRE aussi appelé modèle "méduse". Le NES situé dans la partie C terminale (pas illustrée) interagit avec la protéine CRM1 pour l'exportation du complexe. Images tirées de Fernandes *et al.*, (2012).

LISTE DE RÉFÉRENCES

- Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Überla K. 2010. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *Journal of Virology*, 84(13): 6598-6604.
- Boese A, Galli U, Geyer M, Sauter M, Mueller-Lantzsch N. 2001. The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Letters*, 493: 117-121.
- Bogerd H, Greene WC. 1993. Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type 1 Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo. *Journal of Virology*, 67: 2496-2502.
- Böhnlein E, Berger J, Hauber J. 1991. Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *Journal of Virology*, 65: 7051-7055
- Bouillant AM, Ruckerbauer GM, Nielsen KH. 1989. Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections in vitro. *Research in Virology*, 140(6): 511-529.
- Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen. 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *Journal of Virology*, 64: 881-885.
- Carpenter S, Miller LD, Alexandersen S, Whetstone CA, VanDerMaaten MJ, Viuff B, Wannemuehler Y, Miller JM, Roth JA. 1992. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *Journal of Virology*, 66(2): 1074-1083.
- Corredor AG, St-Louis M-C, Archambault D. 2010. Molecular and biological aspect of the bovine immunodeficiency virus. *Current HIV Research*, 8: 2-13.
- Daelemans D, Costes S, Cho EH, Erwin-Cohen RA, Lockett S, Pavlakis GN. 2004. « In vivo HIV-1 Rev multimerisation in the nucleolus and cytoplasm identified by fluorescence resonance energy transfert ». *Journal of Biological Chemistry*, 279(48): 50167-50175.

- Daugherty MD, Booth D, Jayaraman B, Cheng Y, Frankel AD. 2010 a. HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (28): 12481-12486.
- Daugherty MD, Liu B, Frankel AD. 2010 b. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11): 1337-1343.
- Denner J. Endogenous retroviruses. In: Kurth R, Bannert N (eds) *Retroviruses*. Caister Academic Press, Norfolk, 35-70.
- Desrosiers RC. 2001. Nonhuman lentiviruses. Dans D.M. Knipe and P.M. Howley, *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2095-2122.
- DiMattia MA, Wattsc NM, Stahlc SJ, Raderd C, Wingfieldc PT, Stuarta DI, Stevenb AC, Grimesa JM. 2010. Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *PNAS*, 107 (13): 5810-5814.
- Fernandes JD, Jayaraman B, Frankel AD. 2012. The HIV-1 Rev response element: An RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biology*, 9(1): 6-11.
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Lührmann R. 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82: 475-83
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 90(6): 1051-1060.
- Goff SP. 2001. *Retroviridae: The Retroviruses and their replication*. Dans D.M. Knipe and P.M. Howley, *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. p. 1871-1940
- Gomez Corredor A, Archambault A. 2009. The bovine immunodeficiency virus Rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *Journal of Virology*, 83(24): 12847-12853.

Gomez Cooredor A, Archambault A. 2012. The bovine immunodeficiency virus Rev protein: identification of a novel nuclear import pathway and nuclear export signal among retroviral Rev/Rev-like proteins. *Journal of Virology*, 86(9): 4892-4905.

Gomez Corredor, A. 2012. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine. Thèse de Doctorat, Université du Québec à Montréal, 250 p.

Gonda MA, Braun MJ, Carter SG, Kost TA, Bress JW Jr, Arthur LO, Van der Maaten MJ. 1987. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature*, 330(6146): 388-391.

Gonda MA, Luther DG, Fong SE, Tobin GJ. 1994. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions. *Virus Research*, 32: 155-181.

Gonda MA, Oberste MS, Garvey KJ, Pallansch LA, Battles JK, Pifat DY, Bess JW Jr, Nagashima K. 1990. Development of the bovine immunodeficiency-like virus as a model of lentivirus disease. *Developments in Biological Standardization*, 72: 97-110.

Gonzalez GC, Johnston JB, Nickel DD, Jacobs RM, Olson M, Power C. 2001. Very low prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in western Canadian cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 65(1): 73-76.

Gradil CM, Watson RE, Renshaw RW, Gilbert RO, Dubovi EJ. 1999. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. *Veterinary Microbiology*, 70: 21-31.

Groom HCT, Anderson EC, Lever AML. 2009. Rev: beyond nuclear export. *Journal of General Virology*, 90: 1303-1318.

Güttler T, Madl T, Neumann P, Deichsel D, Corsini L, Monecke T, Ficner R, Sattler M, Görlich D. 2010. NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11): 1367-1376.

Haase, AT. 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, 322: 130-136.

Hadian K, Vincendeau M, Maüsbacher N, Nagel D, Hauck SM, Ueffing M, Loyter A, Werner T, Wolff H, Brack-Werner R. 2009. Identification of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein-recognition Region in the HIV Rev Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48): 33384-33391.

- Heaton PR, Johnstone P, Brownlie J. 1998. Investigation of the cellular tropism of bovine immunodeficiency-like virus. *Research in Veterinary Science*, 65(1): 33-40.
- Heger P, Rosorius O, Koch C, Casari G, Grassman R, Hauber J. 1998. Multimer formation is not essential for nuclear export of human t-cell leukemia virus type 1 Rex. *Journal of Virology*, 72(11): 8659-8668.
- Hirai N, Kabeya H, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 1996. Immunomodulative effects of bovine immunodeficiency-like virus (BIV) – Infection and mixed infection of EIV and bovine leukemia virus on sheep. *Journal of Veterinary Research*, 44(3): 153-163.
- Hoffman D, Schwarck D, Banning G, Brenner M, Mariyanna L, Kreptakies M, Schindler M, Millar DP, Hauber J. 2012. Formation of Trans-Activation competent HIV-1 Rev:RRE complexes requires the recruitment of multiple protein activation domains. *PLoS ONE*, 7(6): e38305.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9: 789-798.
- Hu CD, Kerppola TK. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolour fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, 21(5): 539-545.
- Jain C, Belasco JG. 2001. Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Molecular Cell*, 7: 603-614.
- Kalvatchev Z, Walder R, Perez F, Garzaro D, Barrios M. 1998. Infection of rabbits with R29 strain of bovine immunodeficiency virus: virulence, immunosuppression, and progressive mesenteric lymphadenopathy. *Viral Immunology*, 11(3): 159-166.
- Kempster S, Collins ME, Brownlie J. 2002. Tat protein in MDBK cells does not confer susceptibility to bovine immunodeficiency virus. *Archives of Virology*, 147: 643-649.
- Kerppola TK. 2009. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society Reviews*, 38: 2876-2886.

Krebs FC, Hogan TH, Quiterio S, Gartner S, Wigdahl B. 2001. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. p 29-70 dans HIV Sequence Compendium 2001. Édité par Kuiken C, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber B. Publié par Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

Kubota, S., H. Siomi, T. Satoh, S. Endo, M. Maki, and M. Hatanaka. 1989. Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 162: 963–970.

Larue RS., Lenguel J, Jónsson SR, Andrésdóttir V, Harris RS. 2010. Lentiviral Vif Degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H Protein of Its Mammalian Host and Is Capable of Cross-Species Activity. *Journal of Virology*, 84(16): 8193–8201.

Lee JH, Murphy SC, Belshan M, Sparks WO, Wannemuehler Y, Liu S, Hope TJ, Dobbs D, Carpenter S. 2006. Characterization of functional domains of equine infectious anemia virus Rev suggests a bipartite RNA-binding domain. *Journal of Virology*, 80(8): 3844-3852.

Levin A, Hayouka Z, Brack-Werner R, Volsky DJ, Friedler A, Loyter A. 2009. Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. *Protein Engineering, Design & Selection*, 22(12): 753–763.

Levin A, Hayouka Z, Brack-Werner R, Volsky DJ, Friedler A, Loyter A. 2010. A novel role for the viral Rev protein in promoting resistance to superinfection by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*, 91: 1503–1513.

Levin A, Rosenbluh J, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A. 2010. Integration of HIV-1 DNA Is Regulated by Interplay between Viral Rev and Cellular LEDGF/p75 Proteins. *Molecular Medecine*, 16(1-2): 34-44.

Li L, Li SH, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao R. 2005. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Research*, 15(11-12): 923-934.

Madore SJ, Tiley L, Malim MH, Cullen BR. 1994. Sequence Requirements for Rev Multimerization in Vivo. *Virology*, 202: 186-194.

- Mahy BWJ. 2010. The Evolution and Emergence of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5): 899.
- Malim MH, Cullen BR. 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE : implications for HIV-1 latency . *Cell*, 65(2): 241-248.
- Martin SJ, O'Neill TP, Bilello JA, Eiseman J. 1991. Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves. *Immunology Letters*, 27(2): 81-84.
- McNab WB, Jacobs RM, Smith HE. 1994. A Serological Survey for Bovine Immunodeficiency-like Virus in Ontario Dairy Cattle and Associations between Test Results, Production Records and Management Practices. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 94(58): 36-41.
- Meas S, Kabeya H, Yoshihara S, Ohashi K, Matsuki S, Mikami Y, Sugimoto C, Onuma M. 1998. Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60(11): 1195-1202.
- Meas S, Ruas J, Farias NA, Usui T, Teraoka Y, Mulenga A, Chang KS, Masuda A, Madruga CR, Ohashi K, Onuma M. 2002. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Journal of Veterinary Research*, 50(1): 9-16.
- Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M. 2000. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(3): 329-331.
- Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH. 1996. Nuclear transport of the human immunodeficiency virus type 1, Visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *Journal of Virology*, 70:2350-59.
- Modrich H, Kräusslich HG. 2001. Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 34: 197-217.
- Molina RP, Matukonis M, Paszkiet B, Zhang J, Kaleko M, 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.

- Munro R, Lysons R, Venables C, Horigan M, Jeffrey M, Dawson M. 1998. Lymphadenopathy and non-suppurative meningo-encephalitis in calves experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus (FL112). *Journal of Comparative Pathology*, 119(2): 121-134.
- Nash JW, Hanson LA, St Cyr Coats K. 1995a. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *American Journal of Veterinary Research*, 6: 760-763.
- Nash JW, Hanson LA, St Cyr Coats K. 1995b. Detection of bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction. *American Journal of Veterinary Research*, 56: 445-449.
- Oberste MS, Williamson JC, Greenwood JD, Nagashima K, Copeland TD, Gonda MA. 1993. Characterization of bovine immunodeficiency virus rev cDNAs and identification and subcellular localization of the Rev protein. *Journal of Virology* 67(11): 6395-6405.
- Olsen HS, Cochrane AW, Dillon PJ, Nalin CM, Rosen CA. 1990. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependant on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes & Development*, 4: 1357-1364.
- Onuma M, Koomoto E, Furuyama H, Yasutomi Y, Taniyama H, Iwai H, Kawakami Y. 1992. Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 5(10): 1009-1015.
- Payne SL, Pei X-F, Jia B, Fagerness A, Fuller FJ. 2003. Influence of Long Terminal Repeat and Env on the Virulence Phenotype of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, 78(5): 2479-2485.
- Pifat DY, Ennis WH, Ward JM, Oberste MS, Gonda MA. 1992. Persistent Infection of Rabbits with Bovine Immunodeficiency-Like Virus. *Journal of Virology*, 66(7): 4518-4524.
- Pistor DW, Kremers G-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (9): 407-414.
- Pollard VW, Malim MH. 1998. The HIV-1 Rev Protein. *Annual Review of Microbiology*, 52: 491-532.

Rasband WS. 1997-2004. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Scobie L, Venables C, Sayers AR, Weightman S, Jarrett O. 2001. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Veterinary Record*, 149(15): 459-460.

Shida H. 2012. Role of nucleocytoplasmic RNA transport during the life cycle of retroviruses. *Frontiers in Microbiology*, 3(179): 1-11.

Simon AE, Gehrke L. 2009. RNA conformational changes in the life cycles of RNA viruses, viroids and virus associated RNAs. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1789: 571-583.

Snider TG, Hoyt PG, Jenny BF, Coats KS, Luther DG, Storts RW, Battles JK, Gonda MA. 1997. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13(1): 151-176.

St-Louis MC, Cojocariu M, Archambault D. 2004. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentivirus. *Animal Health Research Reviews*, 5(2): 125-143.

Suhasini M, Reddy TR. 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Current HIV Ressearch*, 7: 91-100.

Van Der Maaten MJ, Booth AD, Segar CL. 1972. Isolation of virus from cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 49: 1649-1657.

Vercruysse T, Pardon E, Vanstreels E, Steyaert J, Daelemans D. 2010. An Intrabody Based on a Llama Single-domain Antibody Targeting the N-terminal α Helical Multimerization Domain of HIV-1 Rev Prevents Viral Production. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28): 21768-21780.

Walder R, Kalvatchev L, Pérez F, Garzaro D, Barrios M. 2001. Bovine immunodeficiency virus in experimentally infected rabbit: tropism for lymphoid and nonlymphoid tissues. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 24(1): 1-20.

Watts NR, Sackett DL, Ward RD, Miller MW, Wingfield PT, Stahl SS. 2000. HIV-1 Rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *The Journal of Cell Biology*, 150(2): 349-360.

- Whetstone CA, Suarez DL, Miller JM, Pesch BA, Harp JA. Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic. *Journal of Virology*, 71(1): 640-644.
- Wright SM, Mleczko A, Coats KS. 2002. Bovine immunodeficiency virus expression in vitro is reduced in the présence in the présence of beta-chemokines, MIP-1alpha, MIP-1beta and Rantes. *Veterinary Research Communications*, 26: 239-250.
- Wu D, Murakami K, Morooka A, Jin H, Inoshima Y, Sentsui H. 2003. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Research*, 97(2): 81-87.
- Yi R, Bogerd HP, Cullen BR. 2002. Recruitment of the Crm1 nuclear export factor is sufficient to induce cytoplasmic expression of incompletely spliced human immunodeficiency virus mRNAs. *Journal of Virology*, 76(5): 2036-2042.
- Zapp ML, Hope TJ, Parslow TG, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 7734-7738.
- Zhang S, Troyer DL, Kapil S, Zheng L, Kennedy G, Weiss M, Xue W, Wood C, Minocha HC. 1997. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization. *Virology*, 236(2): 249-257.
- Zhang S, Wood C, Xue W, Krukenberg SM, Chen Q, Minocha HC. 1997. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(2): 232-235.