



dernier jusqu'aux cellules cibles par un mécanisme qui implique les héparanes sulfates. Sachant que l'invalidation hétérozygote de *Ext1* affecte la fixation de *Lhh* au niveau de la surface cellulaire [8], l'hypothèse a été émise qu'un défaut de synthèse des héparanes sulfates présents à la surface des chondrocytes, suite à une mutation d'un des gènes *EXT*, empêchait la prolifération des chondrocytes et provoquait une différenciation prématurée de ces cellules. Ce modèle est conforté par nos observations d'une expression ectopique de collagène de type X (spécifique des chondrocytes hypertrophiques) [11] au

niveau de certaines cellules de la zone proliférative suggérant que certains chondrocytes formant la partie cartilagineuse des exostoses se différencient de façon prématurée [12]. Cependant, la nature des cellules impliquées dans les stades les plus précoces de la formation des exostoses reste controversée. Alors que certains auteurs considèrent que les exostoses résultent d'une expansion clonale de chondrocytes porteurs d'une mutation somatique d'un des gènes *EXT* ou *EXTL* venant s'ajouter à la mutation germinale déjà présente [13], nous favorisons de notre côté l'hypothèse selon laquelle l'exostose dériverait de

cellules mésenchymateuses qui proliféreraient activement pour se différencier rapidement en chondrocytes hypertrophiques, puis en ostéoblastes, par un mécanisme de transdifférenciation. L'obtention de souris invalidées de façon tissu-spécifique pour l'un des gènes *EXT* devrait faciliter notre compréhension de la genèse des exostoses et de leur possible dégénérescence en tumeurs osseuses malignes. ♦

Exostoses : tumor suppressor proteins involved in synthesis of heparan sulphate

NOUVELLE

PML, un nouvel intermédiaire de l'effet antiviral de l'interféron

Tarik Regad, Mounira K. Chelbi-Alix

➤ Les interférons (IFN) sont des cytokines douées de nombreuses activités biologiques, telles que l'inhibition de la répllication virale, l'inhibition de la multiplication cellulaire, l'induction de l'apoptose ainsi que la modulation de la différenciation et de la réponse immunitaire. L'activité antivirale des IFN est à l'origine de leur découverte. Cette propriété a conduit à l'utilisation des IFN de type I¹ dans le traitement de certaines infections virales, dues par exemple aux virus de papillomes et à ceux des hépatites B et C.

L'IFN induit ses diverses activités biologiques en augmentant l'expression dans la cellule de plus de 200 protéines. Le rôle de la plupart de ces protéines n'est pas encore élucidé. L'expression de certaines est directement impliquée dans le mécanisme de l'action antivirale de l'IFN : c'est la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin (PKR), le sys-

tème 2'5'oligoadénylate synthétase /RNase L, et certaines formes de protéines Mx [1]. Cependant, l'invalidation des trois gènes *PKR*, *RNase L* et *Mx* ne suffit pas à abolir complètement la réponse antivirale de l'IFN α , suggérant l'implication d'autres gènes dans la réponse antivirale.

Des données récentes montrent que PML (*promyelocytic leukaemia*), protéine induite par l'IFN, est responsable de certains effets antiviraux de cette cytokine.

Structure et localisation de PML

Le gène *PML* a été découvert dans la leucémie aiguë promyélocytaire associée à la translocation t(15;17) (➔) qui conduit à sa fusion avec le gène codant pour le récepteur de l'acide rétinoïque (*RAR α*). *PML* code pour une protéine nucléaire qui est localisée soit de façon diffuse dans le nucléoplasme, soit sur les

corps nucléaires (CN), structures de la matrice nucléaire dont la fonction est encore inconnue.

Plus d'une trentaine de protéines

sont associées aux corps nucléaires, mais PML semble en être l'organisateur car ces structures sont absentes dans les cellules *PML*^{-/-} [2]. En

outre, PML est modifiée de façon covalente par SUMO-1 (*small ubiquitin modifier*) selon un processus qui ressemble à l'ubiquitinylation et pour lequel trois sites de liaison ont été identifiés (➔). Cette (➔) m/s modification par SUMO-1 2000, n°11, p. 1242 est indispensable à l'intégrité des corps nucléaires.

Ceux-ci sont aussi altérés dans certaines conditions physiopathologiques, en premier lieu dans la leucémie aiguë promyélocytaire, mais aussi en réponse au stress ou à certaines infections virales.

(➔) m/s
1994, n°8-9, p. 817
et 2001, n°1, p. 14

¹ Les IFN sont classés en deux types selon leurs propriétés antigéniques et biologiques : les IFN de type I comprennent les IFN α et IFN β et sont produits par toutes les cellules en réponse aux virus ou à l'ARN double-brin (ds). L'IFN de type II ou IFN γ est produit par les lymphocytes T et les cellules NK après stimulation par des antigènes ou des mitogènes.

Ils sont en revanche augmentés au cours de traitements par l'IFN.

PML est une phosphoprotéine appartenant à la famille RBCC, caractérisée par la présence de quatre motifs. Le premier est un doigt de zinc de type C3HC4 (*RING finger*) qui est impliqué dans des contacts protéine/protéine. Le motif suivant est composé de deux boîtes B qui sont des doigts de zinc présents en un ou deux exemplaires dans une sous-famille des protéines RBCC. Les boîtes B sont immédiatement suivies par un domaine de dimérisation par hélices hydrophobes, le domaine *coiled-coil*. Chacun de ces domaines est important pour la localisation de PML sur les corps nucléaires. Enfin, PML comprend un signal de localisation nucléaire. Du fait d'épissages alternatifs, il existe en fait plusieurs protéines PML très variables dans leurs extrémités C-terminales [3].

Corps nucléaires PML et infections virales

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de virus de familles différentes à modifier ou à détruire les corps nucléaires [1, 4]. Les raisons de ces phénomènes ne sont pas claires, mais on peut envisager qu'en désorganisant ces structures, certains virus développent une stratégie pour détourner la machinerie cellulaire à leur profit afin de

se multiplier efficacement. Les corps nucléaires seraient également choisis par certains virus pour commencer leur réplication dans le noyau des cellules infectées. Il en résulte une modification de la structure des corps nucléaires car certaines protéines virales s'y accumulent et entraînent leur désorganisation (Tableau 1).

La possibilité d'un rôle de PML, ou des corps nucléaires, dans la défense contre les infections virales avait été évoquée devant l'induction de l'expression de PML par l'IFN [5]. Le promoteur du gène *PML* contient en effet des éléments de réponse fonctionnels pour l'IFN α/β et l'IFN γ [6]. L'IFN induit aussi l'expression de cinq autres protéines qui sont associées aux corps nucléaires comme Sp100, Sp110, Sp140, ISG20 (*interferon-stimulated gene product of 20 kd*) et PA28, le composant 11S du protéasome [1], suggérant que les corps nucléaires pourraient jouer un rôle dans la réponse à l'IFN.

Nous avons montré que l'expression constitutive du gène humain *PML* dans diverses lignées cellulaires leur permet de résister à certains virus de familles différentes, comme le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de la grippe [7,8] ou le HFV (pour *human foamy virus*) [9]. L'étude des mécanismes précis de cet effet protecteur de PML nous a

permis de révéler que cette protéine était capable d'interférer directement avec la réplication du HFV.

PML, un nouveau maillon de l'effet antiviral de l'interféron

Découverts dans les années 1950, les spumavirus HFV (*human foamy virus*), sont des rétrovirus animaux complexes sans pathologie associée. Leur génome comporte deux gènes structuraux, *gag* et *env*, qui codent tous deux pour les protéines entrant dans la composition du virion, le gène *pol* codant pour les protéines enzymatiques, et trois autres gènes régulateurs dont l'un code pour la protéine Tas. Tas est le transactivateur nucléaire indispensable à l'expression du génome viral à partir du promoteur LTR (*long terminal repeat*) localisé en 5', mais aussi d'un promoteur interne situé à l'extrémité 3' du gène *env*. Ce promoteur interne permet l'expression des gènes régulateurs de façon indépendante de celle des gènes structuraux, ce qui permet donc deux niveaux de contrôle de la transcription (Figure 1).

La surexpression de la protéine PML dans différentes lignées cellulaires bloque la réplication virale en agissant au niveau de la transcription du génome viral [9]. PML interagit en effet directement avec la protéine Tas et l'empêche

Virus	Cible	Protéines virales	Mécanismes d'action
Adénovirus	PML	E4-ORf3	Délocalise PML des CN
Virus de l'herpès, HSV1	PML	ICP0	Délocalise PML et Sp100 des CN et induit leur dégradation par un processus dépendant du protéasome
Cytomégalovirus, HCMV	PML	IE1	Diminue la modification de PML par SUMO-1 et délocalise PML des CN
Virus d'Epstein-Barr, EBV	PML	EBNA5	EBNA5 colocalise avec les CN
		BZLF1	BZLF1 délocalise PML des CN
Virus des papillomes	PML	L2	Colocalise avec les CN et recrute deux autres protéines virales L1 et E2
Virus de l'hépatite delta, HDV	PML	L-HDAg	Délocalise PML des CN
Virus de la leucémie à cellules T, HTLV-1	PML	Tax	Délocalise Int-6 des CN vers le cytoplasme
Spumavirus, HFV	PML	Tas	Colocalise avec les CN
Virus de la chorioméningite lymphocytaire, LCMV	PML	Z	Délocalise PML des CN vers le cytoplasme

Tableau 1. Modification des corps nucléaires (CN) par les protéines virales.



de se lier sur le LTR et le promoteur interne, ce qui bloque donc l'effet transactivateur de Tas. L'interaction avec Tas nécessite l'intégrité du domaine *RING finger* de PML et de la région N-terminale de Tas. Les mutants de PML dans ce motif ne sont plus capables de bloquer la transcription virale. En revanche, les mutants pour le domaine *coiled-coil* ou pour les trois lysines cibles des modifications par SUMO (PML 3K) répriment la transcription comme la protéine sauvage (Figure 1) suggérant que l'activité antivirale de PML est indépendante de l'intégrité des corps nucléaires.

En outre, l'effet protecteur de la surexpression de PML contre l'infection par le virus HFV est comparable à celui observé dans des cellules traitées avec une forte dose d'IFN α . Dans les fibroblastes embryonnaires de souris traités à l'IFN α , la transactivation par Tas ainsi que l'expression des protéines virales

sont inhibées. En revanche, dans les mêmes cellules invalidées pour le gène de PML, l'effet antiviral de l'IFN contre ce virus est fortement diminué [9].

Ces résultats montrent donc que PML, qu'elle soit nucléoplasmique ou localisée sur les corps nucléaires, interfère avec la réplication du virus HFV. Elle agit en effet comme répresseur transcriptionnel du LTR et du promoteur interne du HFV, et semble bien

jouer un rôle clé dans l'effet antiviral de l'IFN. Il restera à déterminer si ce mécanisme d'effet antiviral est propre au HFV, ou si PML a la capacité d'interagir avec d'autres transactivateurs viraux. **PML, a mediator of interferon-induced antiviral response**

1. Regad, T, Chelbi-Alix MK. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 2001 ; 20 : 7274-86.
2. Negorev, D, Maul GG. Cellular protein localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 2001 ; 20 : 7234-42.
3. Jensen K, Shiels C, Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 2001 ; 20 : 7223-33.
4. Chelbi-Alix MK, de Thé H. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 1999 ; 18 : 935-41.
5. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, et al. 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 1995 ; 9 : 2027-33.
6. Stadler M, Chelbi-Alix MK, Koken MH, et al. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 1995 ; 11 : 2565-73.
7. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, de Thé H. Regulation of cell growth differentiation and genetics in cancers. In : Tsiftoglou AS, Sartorelli AC, Housman DE, Dexter MT, eds. *Tumor Biology* 1996 ; 99 : 17-27.
8. Chelbi-Alix MK, Quignon F, Pelicano L, Koken MH, de Thé H. Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol* 1998 ; 72 : 1043-51.
9. Regad T, Saib A, Lallemand-Breitenbach V, Pandolfi PP, de Thé H, Chelbi-Alix MK. PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J* 2001 ; 20 : 3495-505

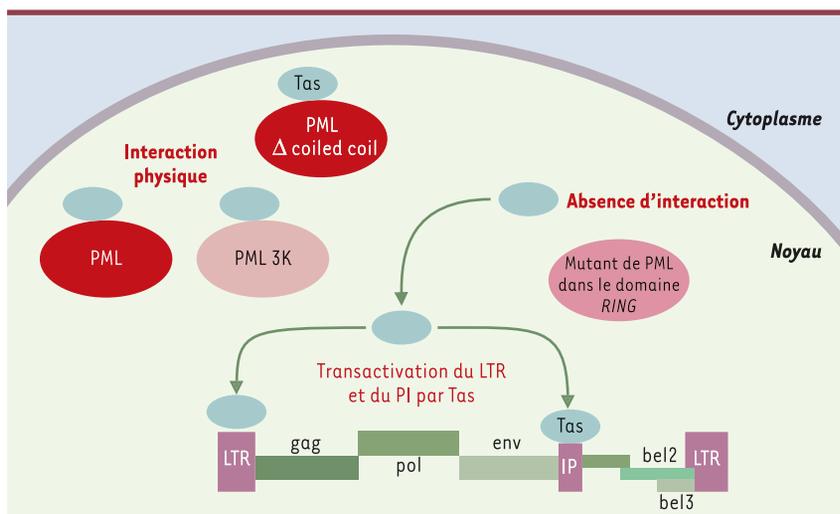


Figure 1. Inhibition de la réplication du spumavirus HFV par PML Le génome du virus HFV est constitué de deux gènes structuraux, *gag* et *env*, codant tous deux pour les protéines entrant dans la composition du virion et du gène *pol* codant pour les protéines enzymatiques. Ces gènes sont encadrés par les LTR (*long terminal repeat*), séquences non codantes qui interviennent dans l'expression du virus, son intégration et sa réplication. Dans le cas du HFV, les gènes régulateurs sont nommés *bel1*, *bel2*, *bel3*, pour *between env and LTR*. *Bel1*, renommé Tas (*transactivating spuma*) est le transactivateur nucléaire indispensable à l'expression virale à partir du LTR mais également à partir d'un promoteur interne (PI) situé à l'extrémité 3' du gène *env*. L'expression des gènes régulateurs est donc indépendante de celle des gènes structuraux. La protéine PML inhibe la réplication virale en interagissant directement avec la protéine virale Tas, ce qui l'empêche de se fixer sur le promoteur LTR et le promoteur interne. Cet effet nécessite l'intégrité du domaine *RING finger* de PML et la région N-terminale de Tas.