



**Régulation de l'expression des protéines
anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-xL par les protéines
virales Tax et HBZ du virus HTLV-1 et identification de
petites molécules anti-Bfl-1 à visée thérapeutique**

Héloïse Macaire

► **To cite this version:**

Héloïse Macaire. Régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-xL par les protéines virales Tax et HBZ du virus HTLV-1 et identification de petites molécules anti-Bfl-1 à visée thérapeutique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10357 . tel-00860987

HAL Id: tel-00860987

<https://theses.hal.science/tel-00860987>

Submitted on 11 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 décembre 2011
par

Mademoiselle Héloïse MACAIRE

TITRE :

Régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ du virus HTLV-1 et identification de petites molécules anti-Bfl-1 à visée thérapeutique

Directeur de thèse :
Madame Hélène VALENTIN

JURY :

Monsieur Philippe JUIN, Rapporteur
Madame Claudine PIQUE, Rapporteur
Monsieur Renaud MAHIEUX, Examineur
Monsieur Germain GILLET, Examineur
Monsieur Jérôme DENIS, Responsable IMAXIO
Madame Hélène VALENTIN, Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie vivement chacun des membres du jury d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon travail. Ainsi, je tiens à remercier Claudine Pique et Philippe Juin d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je remercie également Renaud Mahieux et Germain Gillet d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je tiens également à remercier Nathalie pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir permis de réaliser une thèse à la frontière entre la recherche publique et la recherche privée. Merci Nathalie pour m'avoir fait connaître la société de biotechnologie Imaxio et poussé à suivre la formation DUOP sur la découverte du monde des bio-industries.

Je remercie François Miceli de m'avoir ouvert les portes d'Imaxio et d'avoir financé mes années de thèse et toute l'équipe d'Imaxio pour leur encadrement et leurs conseils scientifiques. Merci à Jérôme Denis, Carine Bardou et Jérôme Pansanel pour leurs encadrements technique et scientifique. Je n'oublie pas non plus Fergal Hill, Audrey Barthelaix, Jean-Baptiste Marchand et Pascal Rochaix pour leur conseils techniques et scientifiques. Je remercie aussi Véronique Morais de la compta et tous les autres « imaxiens » que j'ai côtoyés. Enfin, je remercie Alexandre LeVert qui a récemment pris la direction d'Imaxio, pour son écoute et ses conseils quant à mes aspirations professionnelles.

Mon travail de recherche a été réalisé en grande partie dans l'Unité INSERM « Immunité Infection Vaccination ». Je remercie vivement Jacqueline Marvel pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche.

Je souhaite remercier toute l'équipe de Nathalie pour son accueil chaleureux au sein de cette équipe si féminine d'autant. Un grand merci à Marie-Claude, Anne, Anne-Laure, Blandine, Marlène qui étaient là à mon arrivée. Merci à ceux de passage, comme Marie-Laure et aux nouveaux, comme Natacha. Je remercie particulièrement Aurélien Riquet (M2R) et Johanne Aubin (ESTBB) avec qui j'ai découvert les joies de l'encadrement et qui volent aujourd'hui de leurs propres ailes.

Je souhaite tout particulièrement remercier Hélène, mon directeur de thèse, pour son encadrement scientifique, son écoute, sa disponibilité, sa grande générosité et nos moments partagés enfermés dans ce L3 à prendre soin de nos cellules capricieuses. Merci pour ta confiance, ton soutien technique et moral, dans ces hauts et ces bas si caractéristiques d'une thèse, les discussions scientifiques interminables et les discussions moins scientifiques aussi.

Sans nos collaborateurs, ce projet n'aurait pas autant avancé. Je tiens donc à remercier Madelaine DucDodon, Olivier Hermine, Jean-Michel Mesnard et Louis Gazzolo, spécialistes de HTLV-1, pour l'échange de matériel biologique et leurs observations critiques sur mon projet. Je remercie également Bruno Villoutreix, chemo-informaticien, qui a identifié *in silico* les molécules de la chimiothèque enrichie.

Je remercie également tout le personnel de l'Unité U851 et des plateaux techniques pour leur accueil, leur aide précieuse et la qualité de l'environnement scientifique qu'ils m'ont apportée au cours de cette thèse. Un grand merci en particulier à Bariza Blanquier, Annie Chaboud, Isabelle Grosjean, Didier Nègre, Sébastien Dussurgey, Thibault Andrieu et Fabienne Archer.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis en général, et en particulier mes parents Jean-François et Muriel, mon petit frère Baptiste, ma petite sœur Agathe, sans oublier mes « Colloc's », Cat, Ninou, Amèl, et surtout surtout ma moitié, Stephan. Merci à vous de m'avoir soutenue et supportée au cours de mes études et pour les moments formidables qui nous changent les idées.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES.....	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
Introduction	11
1/ HTLV-1 : UN VIRUS A L'ORIGINE DE LA LEUCEMIE/LYMPHOME T DE L'ADULTE	15
1 – 1/ HTLV-1 : UN VIRUS ONCOGENIQUE	15
1-1-1/ Caractéristiques générales	15
1-1-1a/ Découverte.....	15
1-1-1b/ Epidémiologie et pathologies associées à HTLV-1.....	16
1-1-1c/ La leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL)	18
1-1-2/ Cycle infectieux de HTLV-1	20
1-1-2a/ Description du virus	20
1-1-2b/ Tropisme de HTLV-1.....	22
1-1-2c/ Cycle viral de HTLV-1.....	24
1 – 2/ L'ONCOPROTEINE VIRALE TAX.....	29
1-2-1/ Mécanismes d'action de Tax	29
1-2-1a/ Activation de l'expression du génome viral	29
1-2-1b/ Des fonctions multiples en lien avec la structure et la localisation cellulaire de Tax.....	30
1-2-2/ Activation de la voie NF-κB par Tax.....	33
1-2-2a/ Description de la voie NF- κ B.....	33
1-2-2b/ Activation de la voie NF- κ B par Tax	37
1-2-2c/ Effets des modifications post-traductionnelles de Tax sur l'activation de la voie NF- κ B.....	39
1-2-3/ Activation de la voie AP-1 par Tax	41
1-2-4/ Tax : une protéine oncogénique	45
1-2-4a/ Activation de la prolifération et contrôle du cycle cellulaire par Tax	46
1-2-4b/ Régulation de la survie cellulaire par Tax.....	47
1-2-4c/ Instabilité génétique générée par Tax	51
1-2-4d/ L'initiation de la tumorigénèse par Tax ?	52
1 – 3/ LA PROTEINE VIRALE HBZ	55

1-3-1/ Régulation de l'expression de HBZ et structure de la protéine	56
1-3-2/ Régulation de la transcription virale et cellulaire par HBZ	59
1-3-2a/ Répression de l'activité de Tax et répression virale	59
1-3-2b/ Modulation de la voie AP-1 par HBZ	60
1-3-2c/ Répression de la voie NF- κ B par HBZ	62
1-3-3/ Contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire par HBZ	63
1 – 4/ L'ATLL : UN PROCESSUS MULTI-ETAPES	65
1 – 5/ TRAITEMENT DE L'ATLL.....	70
1-5-1/ Aperçu des approches thérapeutiques actuelles	70
1-5-2/ Recherche de nouveaux agents thérapeutiques	73
2/ L'APOPTOSE REGULEE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 : IMPLICATION DES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES DANS LA LEUCEMOGENESE	75
2 – 1/ L'APOPTOSE : UN TYPE DE MORT CELLULAIRE	75
2 – 2/ L'APOPTOSE REGULEE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2	79
2-2-1/ Les membres de la famille Bcl-2.....	79
2-2-1a/ Description de la famille Bcl-2	80
2-2-1b/ Structure : localisation intracellulaire et profils d'interaction	86
2-2-1c/ Régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2	94
2-2-1d/ Régulation de l'expression et de l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	100
2-2-2 Dérégulation de l'apoptose : développement d'hémopathies malignes et chimiorésistance	108
2 – 3/ STRATEGIES CIBLANT LES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2	113
2-3-1/ Les petites molécules inhibitrices de Bcl-2 ou mimétiques des BH3	114
2-3-1a/ Intérêt des petites molécules organiques.....	114
2-3-1b/ Le Gossypol et ses dérivés.....	115
2-3-1c/ Obatoclax ou GX15-070	117
2-3-1d/ TW-37	118
2-3-1e/ Acide gambogique	118
2-3-1f/ l'ABT-737 et son homologue oral l'ABT-263.....	119
2-3-2/ Phénomène de résistance induit par les molécules mimétiques des BH3	120
2-3-3/ Stratégie ciblant Bfl-1 : aptamère peptidique	122
2-3-3a/ Les aptamères peptidiques.....	122
2-3-3b/ Des outils pour la recherche fondamentale et l'identification de molécules à visée thérapeutique	124

Objectifs de la thèse	126
RESULTATS.....	129
1^{ERE} PARTIE : ARTICLE ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	131
1/ RESUME DU CONTEXTE ET DES PRINCIPAUX RESULTATS	131
2/ ARTICLE : TAX-INDUCED EXPRESSION OF THE ANTI-APOPTOTIC BFL-1 PROTEIN CONTRIBUTES TO SURVIVAL OF HTLV-1-INFECTED T-CELLS	135
3/ RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE	169
3 – 1/ La protéine virale Tax de HTLV-1, mais pas HBZ, augmente l'expression de Bcl-x _L ...	169
3-1-1/ La protéine virale Tax active l'expression de Bcl-x _L via la voie NF-κB	170
3-1-2/ La protéine virale Tax coopère avec c-Jun et JunD de la famille AP-1 pour activer l'expression de Bcl-x _L	172
3-2-3/ La protéine virale HBZ, seule ou en combinaison avec c-Jun ou JunD, n'a pas d'effet sur l'expression de Bcl-x _L	173
3-2-4/ L'activité anti-apoptotique de Tax est médiée entre autres par Bfl-1 et Bcl-x _L	174
3-2-5/ Conclusion.....	176
3 – 2/ Bfl-1 et/ou Bcl-x _L sont des cibles thérapeutiques potentielles pour l'ATLL	177
3-2-1/ Rôle des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et/ou Bcl-x _L dans la survie de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1	177
3-2-2/ L'inhibition simultanée de Bfl-1 et de Bcl-x _L restaure complètement la mort des cellules T C91PL infectées par HTLV-1	178
2^{EME} PARTIE : RESULTATS SUR LES PETITES MOLECULES A VISEE THERAPEUTIQUE :	182
1/ INTRODUCTION	182
2/ RESULTATS	192
2 – 1/ Identification de petites molécules capables de rompre l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50 par un crible haut débit en double hybride chez la levure	192
2-1-1/ Tests pilotes	192
2-1-1a/ Test 1 : choix du couple de levures et du temps d'induction	195
2-1-1b/ Test 2 : validation du choix des paramètres dans les conditions du crible monodose	199
2-1-2/ Crible monodose sur l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50	200
2-1-3/ Confirmation monodose	202
2-1-4/ Confirmation dose-réponse	202
2-1-5/ Conclusion.....	204
2 – 2/ Identification des molécules issues du crible <i>in silico</i> capables de rompre l'interaction Bfl-1ΔCter/Bim par AptaScreen®	205
2 – 3/ Conclusions sur les cribles.....	207

2 – 4/ Caractérisation biochimique et fonctionnelle des petites molécules issues des cribles Aptascreen®	207
2 – 5/ Rôle des molécules inhibitrices de Bfl-1 sur la mortalité de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.....	209
2-5-1/ IBF-18 induit spécifiquement la mort des cellules T MT-4 infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 est responsable de leur survie.....	209
2-5-2/ IBF-18 sensibilise les cellules T MT-4 infectées par HTLV-1 à la mort induite par l'ABT-737	211
3/ CONCLUSIONS	213
4/ MATERIELS & METHODES	215
4 – 1/ Souche de levures, lignées cellulaires et réactifs	215
4 – 2/ Clonage par recombinaison homologue chez la levure	215
4 – 3/ Transformation chez la levure	216
4 – 4/ Tests pilotes et confirmation en dose-réponse.....	216
4 – 5/ Crible monodose haut débit Aptascreen®.....	218
4 – 6/ Calcul du pourcentage d'inhibition.....	218
4 – 7/ Test de mortalité cellulaire	219
1/ EXPRESSION ET ROLE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X _L DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LES CELLULES T INFECTÉES PAR HTLV-1.....	224
2/ REGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X _L DE LA FAMILLE BCL-2 PAR LES PROTEINES VIRALES TAX ET HBZ ET CONSÉQUENCES SUR LA SURVIE CELLULAIRE	226
3/ MODELE PRESENTANT L'EXPRESSION ET LE ROLE DANS LA SURVIE CELLULAIRE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X _L AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ATLL	235
4/ IDENTIFICATION DE PETITES MOLECULES A VISEE THERAPEUTIQUE DIRIGÉES CONTRE BFL-1.....	239
5/ CONCLUSION	246

Liste des Figures

Figure 1 : Cellules d'ATLL typiques présentant un noyau en forme de fleur.....	18
Figure 2 : Structure du virion de HTLV-1	20
Figure 3 : Génome et transcrits de HTLV-1	22
Figure 4 : Représentation schématique du cycle viral de HTLV-1	25
Figure 5 : Schéma représentant la structure de Tax.....	32
Figure 6 : Les voies de signalisation NF- κ B classique et alterne	35
Figure 7 : Dérégulation des voies de signalisation NF- κ B alterne et classique par la protéine virale Tax dans le cytoplasme et dans le noyau	38
Figure 8 : Membres de la famille AP-1	42
Figure 9 : Activation de la voie AP-1	43
Figure 10 : Liste non exhaustive des cibles de Tax et des conséquences sur le phénotype cellulaire	45
Figure 11 : Tax favorise la leucémogénèse	55
Figure 12 : Différentes isoformes de HBZ	57
Figure 13 : Structure et fonctions de HBZ	58
Figure 14 : Modèle de développement de l'ATLL	66
Figure 15 : Stratégies thérapeutiques actuelles contre les différentes formes de l'ATLL.....	71
Figure 16 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose.....	78
Figure 17 : Structure des membres de la famille Bcl-2	81
Figure 18 : Représentation des structures tridimensionnelles des membres de la famille Bcl-2.....	87
Figure 19 : Localisation des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	89
Figure 20 : Profils d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2.....	92
Figure 21 : Régulation des membres effecteurs Bax / Bak par les membres de la famille Bcl-2.....	94
Figure 22 : Modèle de sensibilisation	97
Figure 23 : Modèles de dé-répression.....	98
Figure 24 : Modèle de neutralisation.....	99
Figure 25 : Régulation de la transcription de <i>bfl-1</i>	103
Figure 26 : Régulation de l'expression et de la stabilité de Bfl-1	105
Figure 27 : La surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 maintient la survie des cellules tumorales	109
Figure 28 : Structure de quelques molécules mimétiques des BH3.....	116
Figure 29 : Structure d'un aptamère peptidique	123
Figure 30 : Tax active la transcription de <i>bcl-x_L</i> dans les cellules HeLa	170
Figure 31 : La voie NF- κ B classique inhibe partiellement la transcription de <i>bcl-x_L</i> et de <i>bfl-1</i> dans les lignées T infectées par HTLV-1	171
Figure 32 : La protéine virale Tax coopère avec les membres c-Jun et JunD de la famille AP-1 pour activer la transcription de <i>bcl-x_L</i>	172
Figure 33 : La protéine virale HBZ seule ou en combinaison avec c-Jun ou JunD n'active pas l'expression de Bcl- χ_L	173
Figure 34 : Expression des transcrits de <i>bcl-x_L</i> dans des cellules Jurkat exprimant stablement les protéines virales Tax et HBZ.....	174

Figure 35 : L'activité anti-apoptotique de Tax est médiée entre autres par l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x _L	176
Figure 36 : Rôle de Bfl-1 et de Bcl-x _L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1	178
Figure 37 : Effet de l'ABT-737 sur la mortalité des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1	179
Figure 38 : Bfl-1 et Bcl-x _L coopèrent pour induire la survie des cellules C91PL	180
Figure 39 : Stratégies thérapeutiques ciblant Bfl-1	184
Figure 40 : Principe du test de luminescence double hybride chez la levure, illustration de l'interaction protéine-ligand Bfl-1/Apt50	185
Figure 41 : Principe du crible haut débit de petites molécules de double luminescence en double hybride chez la levure.....	187
Figure 42 : Organisation du projet visant à identifier des molécules dirigées contre Bfl-1	190
Figure 43 : Cinétique d'induction de l'expression de la luciférase Luc ou Ruc par le galactose	196
Figure 44 : Comparaison des signaux luminescents émis par les levures exprimant Bfl-1ΔCter/Apt50 avec ceux émis par les levures exprimant appât-Ctl/proie-Ctl	198
Figure 45 : Validation du meilleur couple de combinaisons et du temps d'induction pour le crible monodose	200
Figure 46 : Représentation du pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50 en fonction du pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle pour chaque molécule	201
Figure 47 : Profils d'inhibition des interactions protéine-protéine induits par IBF-79, IBF-80 et IBF-81	204
Figure 48 : Profils d'inhibition des interactions protéine-protéine induits par 3 molécules capables d'empêcher l'interaction Bfl-1ΔCter/Bim	206
Figure 49 : Effet des petites molécules sur la mortalité des lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1	210
Figure 50 : La molécule IBF-18 sensibilise les cellules MT-4 à la mort cellulaire induite par l'ABT-737	212
Figure 51 : Mode opératoire de mise en plaque	217
Figure 52: Modèle présentant l'expression et le rôle dans la survie cellulaire des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x _L au cours du développement de l'ATLL	237

Abréviations

Akt	protein kinase B	protéine kinase B
AP-1	activator protein 1	protéine activatrice 1
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1	
ATF	activating transcription factor	facteur de transcription activateur
ATLL	adult T-cell leukemia/lymphoma	leucémie/lymphome T de l'adulte
AZT	zidovudine	
BER	base excision repair	réparation par excision de base
CBP	CREB-binding protein	protéine de liaison à CREB
C/EBP β -A	CCAAT/enhancer-binding protein β isoform A	
CMH		complexe majeur d'histocompatibilité
CREB	cAMP responsive element binding protein	protéine de liaison aux éléments de réponse AMPc
CTL	cytotoxic T lymphocyte	lymphocyte T cytotoxique
DC	dendritic cells	cellule dendritique
EBV	Esptein-Barr virus	virus d'Epstein-Barr
EBNA-2	EBV nuclear antigen-2	
ERK	extracellular-signal-regulated kinase	
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma	lymphome B diffus à larges cellules
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	
HBZ	HTLV-1 bZIP-factor	
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	
HTLV-1	human T-cell leukemia virus type 1	virus humain T lymphotrope de type 1
IFN- α	interferon-alpha	interféron-alpha
I κ B	inhibitor of κ B	inhibiteur de κ B
IKK	I κ B kinase	kinase des I κ B
JNK	JUN amino-terminal kinase	
LLC	chronic lymphocytic leukemia cells	leucémie lymphoïde chronique
LMP1	latent membrane protein 1	
MAPK	mitogen-activated protein kinases	
MEF	mouse embryonic fibroblaste	fibroblastes d'embryon de souris
MEKK1	mitogen-activated protein/ERK kinase kinase 1	kinase de la kinase de la protéine active par les mitogènes et de ERK
MLBCL	mediastinal large B-cell lymphoma	lymphome B à larges cellules du médiastin
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization	perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
NEMO	NF- κ B essential modulator	modulateur essentiel de NF- κ B
NES	nuclear export signal	signal d'export nucléaire
NF- κ B	nuclear factor-kappaB	Facteur nucléaire κ B

NFAT	n uclear f actor of a ctivated T -cells	Facteur nucléaire des cellules T activées
NIK	NF - κ B-inducing k inase	kinase d'induction de NF-κB
NK	n atural k iller	
NLS	n uclear l ocalization s ignal	signal de localisation nucléaire
NOD/SCID	n on o bese d iabetic / s evere c ombined i mmunode f icient	immunodéficiencia combinée sévère / diabétique non obèse
ORF	o pen r eadin f rame	cadre ouvert de lecture
PBL	p eripheral b lood l ymphocytes	lymphocytes du sang périphérique
PBMC	p eripheral b lood m ononuclear c ells	cellules mononuclées du sang périphériques
PDZ		PSD95, Dlg, ZO-1
PHA	phytohemagglutinin	
PI3K/Akt	p hosphatidylinositol 3 - k inase/protein kinase B	
PMA	p horbol 12- m yristate 13- a cetate	
PTLV	p rimate T lymphotropic v irus	virus de primate T lymphotrope
ROS	r eactive o xxygen s pecies	espèces réactives de l'oxygène
RxRE	R ex-responsive e lement	élément de réponse à Rex
SCLC	s mall c ell l ung c arcinoma	cancers des poumons à petites cellules
SRF	s erum r esponsive f actor	facteur de réponse au sérum
STLV	s imian T lymphotropic v irus	virus simien T lymphotrope
TCR	T -cell r eceptor	récepteur des cellules T
TNF-α	t umor n ecrosis f actor α	facteur alpha de nécrose des tumeurs
TSP/HAM	t ropical s pastic p araparesy / H TLV-1 a ssociated m yelopathy	paraparésie spastique tropicale / myélopathie associée à HTLV-1
TxRE	T ax responsive e lement	élément de réponse à Tax
UTR	u ntranslated r egions	région non traduite
vCRE	v irale c yclic AMP response e lement	élément de réponse à l'AMPc viral

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'établissement de cancers est un long processus nécessitant plusieurs étapes qui permettent une transformation progressive de la cellule normale en cellule maligne. Ces différentes étapes se traduisent par l'apparition d'altérations génétiques dans la cellule. La plupart des dommages génétiques sont corrigés par des mécanismes de réparation de l'ADN. En l'absence de réparation, les cellules endommagées sont éliminées par l'organisme. Le défaut d'élimination de telles cellules crée un contexte favorable à l'acquisition d'altérations génomiques supplémentaires et à l'immortalisation et la transformation de cellules précancéreuses en cellules malignes. Ces dernières possèdent différentes caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg. Les six caractéristiques initialement décrites en 2000 sont 1) la résistance à la mort cellulaire, 2) l'induction de l'angiogenèse, 3) le potentiel d'invasion et de formation des métastases, 4) l'immortalisation, 5) l'insensibilité aux signaux suppresseurs de croissance et 6) l'autosuffisance en signaux de prolifération. Depuis, de nouvelles caractéristiques favorisant la tumorigenèse ont émergé. Ces caractéristiques sont 1) l'instabilité génomique et l'apparition de mutations, 2) l'inflammation provoquée par la tumeur, 3) l'échappement à la destruction des cellules cancéreuses par les cellules du système immunitaire, tels que les lymphocytes B et T, les macrophages et les cellules NK (**n**atural **k**iller), et 4) la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire (*Hanahan and Weinberg, 2011*).

L'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard s'intéresse depuis plusieurs années au rôle de Bfl-1 (**B**cl-2 fetal liver), une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (**B**-cell lymphoma-**2**), dans les pathologies auto-immunes et cancéreuses. Les protéines pro- et anti-apoptotiques de cette famille sont impliquées dans la régulation de l'apoptose, un type de mort cellulaire programmée. Leur expression régule la survie des cellules saines et contrôle notamment l'élimination des cellules par apoptose. Dans les cellules endommagées, suite en particulier à des stress génotoxiques ou une infection virale, l'induction de l'expression des protéines pro-apoptotiques et l'inhibition de l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 induit l'élimination des cellules par apoptose. Cependant, dans les cellules cancéreuses, une dérégulation de leur expression en faveur d'une surexpression des

membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est retrouvée et expliquerait la résistance à la mort des cellules cancéreuses, une des caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg (*Hanahan and Weinberg, 2011*).

Il est maintenant bien établi que l'émergence de cancers peut être favorisée pas des pathogènes, dont les virus. A ce jour, six virus responsables de tumeurs humaines ont été identifiés (*D'Agostino et al., 2005*) : le virus d'Epstein-Barr (EBV), l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), le virus de l'hépatite B (HBV), le papillomavirus humain (HPV), le virus de l'hépatite C (HCV) et le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1), auquel je me suis intéressée durant ma thèse. Les cellules infectées sont normalement reconnues par les cellules du système immunitaire de l'hôte qui les éliminent. Cependant, au cours de leur évolution, les virus ont acquis des mécanismes permettant d'inhiber la mort des cellules qu'ils infectent afin d'échapper à la pression immunitaire de l'hôte et/ou d'accomplir leur cycle viral. Certains virus inhibent l'apoptose régulée par les membres de la famille Bcl-2 en codant pour des homologues viraux des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou en régulant l'expression des membres anti-apoptotiques cellulaires de la famille Bcl-2 (*Hardwick and Bellows, 2003*). Quelques illustrations de ces mécanismes sont présentées ci-dessous.

KSHV, également connu sous la terminologie HHV-8 (**human herpesvirus 8**), infecte principalement les lymphocytes B et les cellules endothéliales. L'infection par KSHV est associée au développement du sarcome de Kaposi et d'un lymphome B (PEL pour **p**rimar**y e**ffusion B cell lymphoma). KSHV code pour KSBcl-2, une protéine homologue aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Comme nous le discuterons par la suite, la stabilité et l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont notamment régulées par des modifications post-traductionnelles au niveau d'une boucle non structurée. La protéine KSBcl-2 se distingue de ces homologues cellulaires par la perte de cette boucle non structurée, renforçant sa stabilité et son activité anti-apoptotique et favorisant ainsi la survie des cellules infectées par KSHV.

EBV, également appelé HHV-4 (**human herpesvirus 4**), infecte principalement les lymphocytes B et les cellules épithéliales. L'infection par EBV peut conduire au développement de pathologies lymphoprolifératives et à différentes tumeurs, dont le lymphome de Burkitt. EBV code non seulement pour une protéine homologue aux membres

anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, BALF1, mais également pour des protéines capables d'induire l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L (Bcl-2-like protein 1), une autre protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Ainsi, les protéines virales LMP1 (latent membrane protein 1) et EBNA2 (EBV nuclear antigen-2) de EBV activent le promoteur de *bfl-1* via respectivement les facteurs NF-κB (nuclear factor-κappaB) et CBF1 (D'Souza et al., 2004; Pegman et al., 2006). La protéine LMP2A de EBV induit l'expression de Bcl-x_L dans des souris transgéniques exprimant LMP2A (Bultema et al., 2009; Portis and Longnecker, 2004). Ainsi, EBV inhibe l'apoptose régulée par les protéines de la famille Bcl-2 à deux niveaux : directement en codant pour des analogues aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et indirectement en codant pour des protéines capables d'induire l'expression des membres anti-apoptotiques cellulaires de la famille Bcl-2.

HTLV-1 est un rétrovirus appartenant à l'espèce des PTLV (primate T lymphotropic virus) regroupant les virus simiens STLV (simian T lymphotropic virus) et quatre types de virus humains (HTLV-1, -2, -3 et -4). Contrairement à HTLV-1, -2 et aux STLV-1, -2 et -3, qui sont des virus oncogènes, aucune pathologie n'a été clairement associée aux types HTLV-3 et -4. HTLV-2 infecte principalement les cellules T CD8⁺ et pourrait conduire dans de rares cas à un lymphome T CD8⁺ cutané ou à une neuromyélopathie (Gessain et al., 2004). HTLV-1 infecte principalement les cellules T et peut conduire entre autres au développement de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL) caractérisée par l'expansion clonale de lymphocytes T CD4⁺ ou à des pathologies inflammatoires. HTLV-1 ne code pas pour des homologues aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, mais pour des protéines capables de moduler l'expression de gènes cellulaires. En dérégulant l'expression des gènes cellulaires, les protéines virales Tax et HBZ (HTLV-1 bZIP-factor) favorisent le processus leucémogène ou le maintien du phénotype tumoral. Ainsi, la protéine oncogénique Tax module entre autres l'expression de gènes contrôlant l'apoptose, puisque Tax induit l'expression de Bcl-x_L en activant les facteurs de transcription NF-κB et CREB (Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000; Tsukahara et al., 1999).

Par conséquent, la régulation de l'expression de protéines anti-apoptotiques, quelles soient d'origine virale ou cellulaire, est un des mécanismes permettant aux virus d'inhiber la mort des cellules qu'ils infectent. En dérégulant les mécanismes de contrôle de l'apoptose, les virus favorisent la survie des cellules infectées et endommagées et l'accumulation de

nouvelles altérations génétiques. Ce processus peut conduire ensuite à l'émergence d'un clone malin résistant à la mort cellulaire et capable de proliférer.

Dans ce contexte, l'ensemble de mon travail de thèse a eu deux objectifs. Le premier objectif était de proposer une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'apoptose par les protéines virales Tax et HBZ de HTLV-1, avec un intérêt particulier pour le rôle des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L. Le deuxième objectif était de rechercher des petites molécules dirigées contre Bfl-1 afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la leucémie associée à HTLV-1. En préliminaire à l'exposé des résultats de ce travail, une étude bibliographique, divisée en deux parties, est présentée. Une première partie décrit le virus HTLV-1 et l'ATLL associée à HTLV-1. Le rôle des protéines virales Tax et HBZ de HTLV-1 dans la leucémogénèse sera abordé. Dans une deuxième partie, les mécanismes de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2 seront présentés. Leur dérégulation dans les cancers et les stratégies anti-tumorales visant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 seront détaillés.

1/ HTLV-1 : UN VIRUS A L'ORIGINE DE LA LEUCEMIE/LYMPHOME T DE L'ADULTE

1 – 1/ HTLV-1 : UN VIRUS ONCOGENIQUE

1-1-1/ Caractéristiques générales

1-1-1a/ Découverte

Au Japon, K. Takatsuki décrit pour la première fois en 1976 un sous-groupe de leucémie T qu'il appela leucémie T de l'adulte (ou ATL pour **adult T-cell leukemia**) (*Uchiyama et al., 1977*). Il établit alors des lignées cellulaires T (MT-2 et MT-4) dérivées de ces patients par une co-culture de cellules leucémiques de patients et de cellules saines de sang de cordon. En 1982, Yoshida *et al.* identifient un rétrovirus dans les cellules MT-2 et l'appellent ATLTV pour **adult T-cell leukemia virus**. Ils découvrent ensuite que la lignée cellulaire MT-2 est d'origine de sang de cordon et non de cellules d'ATL. Les cellules MT-2 proviennent donc de cellules saines qui ont été infectées par le virus produit par les cellules d'ATL. L'association entre l'infection par l'ATLV et l'ATL est établie seulement en 1982 (*Yoshida et al., 1982*).

En parallèle, le groupe de R. Gallo aux Etats-Unis identifie un rétrovirus dans une lignée cellulaire T (HuT-102) dérivée d'un patient présentant un lymphome T cutané, rétrospectivement diagnostiqué comme ATL. Il nomme ce virus HTLV pour **human T-cell leukemia virus** (*Poiesz et al., 1980*). C'est en 1984 qu'une étude démontre l'identité de séquence entre l'ATLV japonais et l'HTLV américain (*Watanabe et al., 1984*). Ce virus est alors appelé virus humain T lymphotrope de type 1 (HTLV-1 pour **human T-cell leukemia virus type 1**) et la leucémie ou leucémie/lymphome associée est appelée ATL ou ATLL pour **adult T-cell leukemia/lymphoma**.

1-1-1b/ Epidémiologie et pathologies associées à HTLV-1

L'infection par HTLV-1 suit une distribution géographique particulière puisque le virus n'est pas réparti de manière ubiquitaire, mais plutôt en foyers endémiques. En effet, la plus forte prévalence de HTLV-1 peut atteindre jusqu'à 37% dans certaines régions limitées du Japon, tandis qu'une prévalence de 0,0039% est observée parmi les donneurs de sang en France (*Proietti et al., 2005*). Une forte prévalence a été décrite dans certaines îles du Japon, dans les Caraïbes, l'Afrique Centrale et certaines régions d'Amérique du Sud, d'Amérique centrale, de Roumanie et d'Iran (*Proietti et al., 2005; Sonoda et al., 2011*). L'ATLL représente jusqu'à 25% des lymphomes T dans ces régions (*Hartmann and Rosenwald, 2010*). La prévalence mondiale est estimée à 10-20 millions d'individus séropositifs (*Proietti et al., 2005*). Cependant, la prévalence de HTLV-1 dans les zones non endémiques n'est pas étudiée et la plupart des études sont issues de cohortes de donneurs de sang qui ne sont pas représentatifs de la population générale. De ce fait, la prévalence mondiale réelle n'est pas clairement définie (*Hlela et al., 2009*).

Le virus est transmis de la mère au nouveau-né lors de l'allaitement ou à l'âge adulte par les voies sexuelles ou sanguines (*Proietti et al., 2005*). Parmi les individus infectés, 95% restent asymptomatiques. Le stade asymptomatique est caractérisé par une faible charge provirale (moins de 0,5% de cellules infectées) et l'absence de signe clinique. Le provirus est intégré de manière polyclonale ou oligoclonale dans les lymphocytes T CD4⁺. Comme les cellules T cytotoxiques (CTL) reconnaissent et éliminent les cellules infectées, un équilibre entre cette réponse immunitaire et les cellules T CD4⁺ infectées s'établit et entretient la faible charge provirale (*Kannagi et al., 2011*).

5 à 10 % des individus infectés par HTLV-1 développent une paraparésie spastique tropicale, encore appelée myélopathie associée à HTLV-1 ou TSP/HAM (pour **tropical spastic paraparesy / HTLV-1 associated myelopathy**) ou un ATLL. Moins de 5% des individus peuvent développer d'autres pathologies comme une uvéite, une dermatite infectieuse, un syndrome de Sjögren ou une pneumopathie. Par ailleurs, en perturbant l'équilibre immunitaire de l'hôte, les complications infectieuses augmentent couramment le risque de développer une pathologie associée à HTLV-1 (**Tableau – 1**) (*Proietti et al., 2005; Verdonck et al., 2007*).

Tableau – 1 : Pathologies associées à l'infection par HTLV-1

Pathologies	Association à l'infection par HTLV-1
<u>Pathologies inflammatoires :</u>	
TSP/HAM	+++
Uvéite	++
Dermatite infectieuse	++
Arthrite	++
Syndrome de Sjögren	+
Polymyosite, myosite à inclusion	+
Thyroïdite	+
Pneumopathie	+
Alvéolite lymphocytaire T	+
<u>Pathologies cancéreuses :</u>	
ATLL	+++
Lymphome T cutané	+
<u>Complications infectieuses :</u>	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	+++
Gale	+
Tuberculose	++
Lèpre	++

Pathologies associées ou potentiellement associées à l'infection par HTLV-1. Le degré de confiance est issu de différents types d'études : +++ : association prouvée par l'étude de cohorte ; ++ : association suggérée par l'étude de cas-témoin (étude rétrospective) ; + : cas rapporté (D'après la revue (Verdonck et al., 2007)).

La TSP/HAM est une maladie neuro-dégénérative qui se caractérise par une inflammation chronique du système nerveux central. L'infiltration des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ infectées et la démyélinisation causent entre autres des paralysies spastiques des membres inférieurs et des déficits sensoriels (Duc Dodon et al., 2010; Verdonck et al., 2007). La TSP/HAM, qui se développe 4 à 5 ans après l'infection, corrèle généralement avec une charge provirale élevée et une forte réponse CTL spécifique de HTLV-1 (Kannagi et al., 2011). Des données épidémiologiques suggèrent que les transmissions sexuelle et sanguine représentent les principaux modes de transmission conduisant au développement d'une TSP/HAM (Proietti et al., 2005).

L'ATLL est caractérisée par une prolifération monoclonale de lymphocytes dont le phénotype est caractéristique de cellules T CD4⁺ activées. L'ATLL se manifeste à l'âge adulte après une période de latence clinique d'environ 20 à 70 ans. L'ATLL est majoritairement associée à une transmission via l'allaitement prolongé. Cependant, quelques rares cas d'ATLL après transfusion sanguine ont été décrits (*Proietti et al., 2005*). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée en particulier à l'ATLL.

1-1-1c/ La leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL)

L'ATLL est caractérisée par la prolifération de cellules typiques présentant les caractéristiques suivantes : noyau polylobé en forme de fleur, chromatine condensée et homogène, nucléole absent ou petit et un cytoplasme agranulaire et basophile (**Figure 1**) (*Tsukasaki et al., 2009*). D'un point de vue génétique, les cellules d'ATLL présentent de nombreuses anomalies chromosomiques, comme des gains au niveau des chromosomes 14q, 7q et 3p ou des pertes au niveau du chromosome 13q. Cependant, aucune anomalie spécifique de l'ATLL n'a été décrite (*Bazarbachi et al., 2011; Tsukasaki et al., 2009*). Les clones malins infectés par HTLV-1 peuvent persister au moins 7 ans chez un même individu, suggérant la mise en place de mécanismes de survie (*Cavrois et al., 1996; Etoh et al., 1997*).

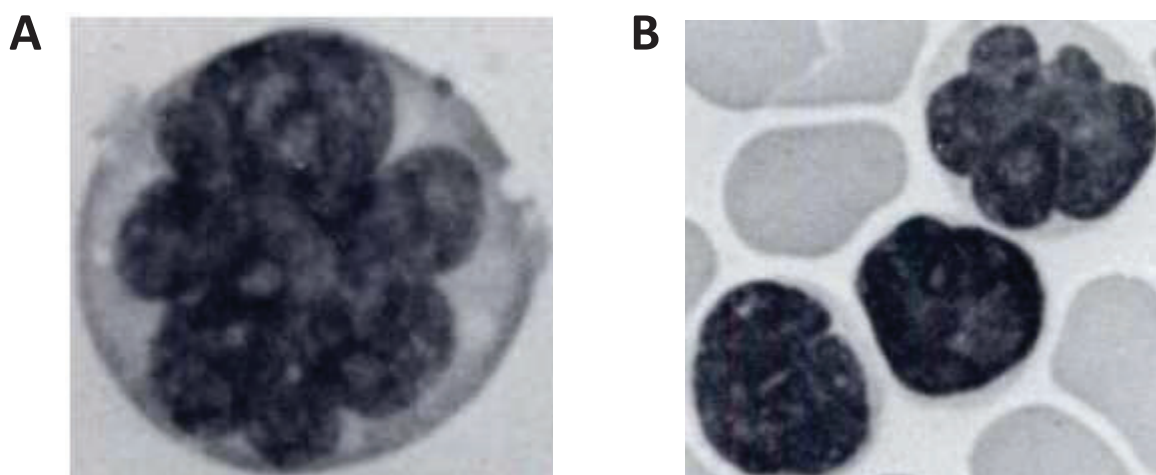


Figure 1 : Cellules d'ATLL typiques présentant un noyau en forme de fleur

Des cellules lymphoïdes atypiques et hyperlobulées du sang périphérique issues de deux patients atteints d'ATLL (**A**) et (**B**) sont présentées (Coloration au May-Giemsa). Grossissement : x1500 (*Uchiyama et al., 1977*).

L'ATLL évolue en différents stades cliniques (*Bazarbachi et al., 2004; Bazarbachi et al., 2011; Matutes, 2007*) :

- la forme pré-ATLL correspond à un état intermédiaire entre les individus asymptomatiques et les patients atteints d'ATLL. Cet état est caractérisé par la présence de lymphocytes anormaux, similaires aux cellules d'ATLL dans le sang périphérique. Ce stade peut disparaître spontanément ou évoluer vers l'une des quatre formes cliniques suivantes.

- la forme indolente ou progressive est caractérisée par l'infiltration de rares cellules leucémiques au niveau de la peau et des poumons. Dans ces cellules, le provirus HTLV-1 est intégré de manière monoclonale. Cependant, le nombre de lymphocytes totaux reste normal.

- la forme chronique présente plus de 5% de cellules d'ATLL dans le sang périphérique. Une lympho-adénopathie (augmentation du volume des ganglions lymphatiques), une hépato-splénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate) ou des lésions de la peau, dues à l'infiltration des cellules leucémiques, peuvent apparaître. Les formes indolentes et chroniques peuvent être stables pendant des mois voire des années ou peuvent évoluer vers les formes très agressives lymphomateuses ou aiguës.

- la forme lymphomateuse est caractérisée par une lympho-adénopathie sévère qui atteint l'ensemble de l'organisme avec moins de 1% des cellules leucémiques dans le sang périphérique. La forme lymphomateuse est associée à un mauvais pronostic.

- la forme aiguë présente un nombre élevé de cellules d'ATLL, une lympho-adénopathie, une hépato-splénomégalie et de nombreuses lésions cutanées. Dans 70% des cas, une hypercalcémie est observée. Les patients sont immunodéficients et sensibles aux infections opportunistes. Cette forme d'ATLL, très agressive, est résistante à toute chimiothérapie conventionnelle et la moyenne de survie des patients est inférieure à un an.

1-1-2/ Cycle infectieux de HTLV-1

1-1-2a/ Description du virus

HTLV-1 est un rétrovirus de type C appartenant au genre *Deltarétrovirus*. Le virion, d'environ 100 nM de diamètre, est composé d'un ARN simple brin positif présent en deux exemplaires et protégé par une nucléocapside. Le génome et les protéines virales intégrase et réverse-transcriptase sont contenus dans une capside. HTLV-1 est un virus enveloppé. L'enveloppe de HTLV-1, constituée de la membrane plasmique cellulaire associée aux protéines virales de surface, est formée lors du bourgeonnement (Figure 2).

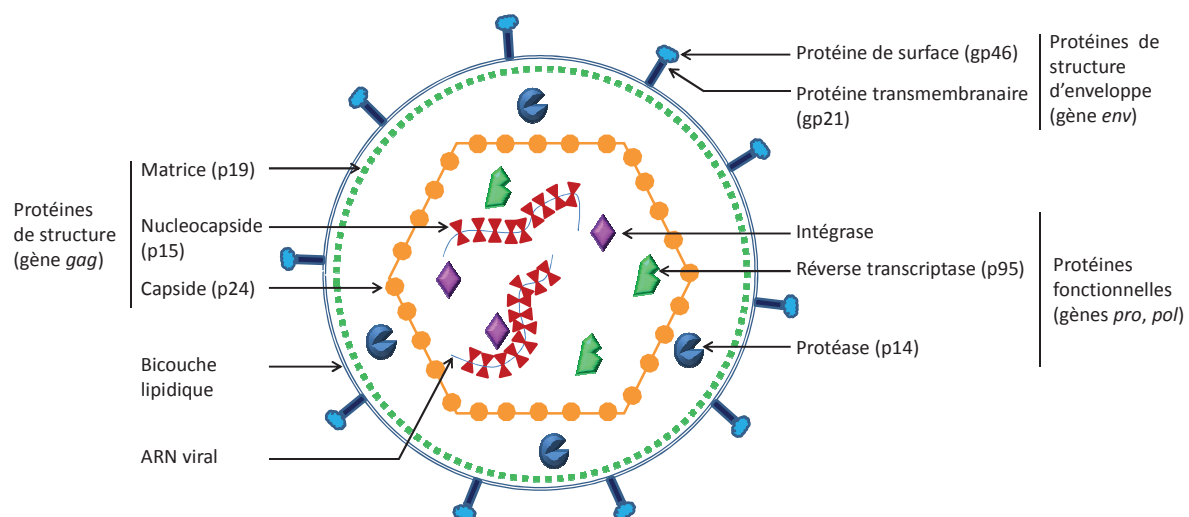


Figure 2 : Structure du virion de HTLV-1

L'ARN viral est protégé par la nucléocapside. Un niveau de protection supplémentaire est assuré par une capside hélicoïdale contenant l'ARN viral et les protéines virales intégrase et réverse transcriptase. L'ensemble est englobé au sein d'une membrane formée par la membrane plasmique de la cellule et les glycoprotéines virales d'enveloppe. Le gène *gag* code pour les protéines de structure, le gène *env* pour les protéines de structure d'enveloppe et les gènes *pro* et *pol* pour les enzymes virales (D'après (Verdonck et al., 2007)).

Le génome de HTLV-1 d'environ 9kb est flanqué à chaque extrémité de deux LTR (long terminal repeat) en 5' et en 3' qui régulent la transcription virale (Figure 3A). Le génome de HTLV-1 se distingue des autres rétrovirus puisqu'il possède, en plus des gènes classiques *gag* (*group antigen*), *pro*, *pol* et *env*, une région nommée pX codant pour des protéines additionnelles. L'expression des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* est sous le contrôle du

LTR-5'. Le gène *gag* code pour les protéines p19 (formation de la couche matricielle sous la membrane interne), p24 (formation de la capside) et p15 (formation de la nucléocapside). Les gènes *pro* et *pol* codent pour les enzymes virales p14 (protéase), p95 (retro-transcriptase) et l'intégrase (Figure 3B). Le gène *env* code pour la glycoprotéine de surface gp46 et la protéine transmembranaire gp21. Enfin, la région pX possède quatre cadres ouverts de lecture (ORF I à ORF IV) et code pour des protéines par ses deux brins d'ADN positif et négatif. Un degré supplémentaire de complexité par un épissage complexe des ARNm viraux (épissage alternatif, simple ou double) permet à cette région pX de coder pour plusieurs protéines additionnelles non structurales impliquées dans la pathogénicité. Les deux protéines régulatrices Tax et Rex et les protéines accessoires (p12, p13, p30, p21) de la région pX sont codées par le brin positif et leur transcription est sous le contrôle du LTR-5'. En revanche, la protéine HBZ, dont l'expression est sous le contrôle du LTR-3', est codée par le brin négatif (Figure 3B). Ainsi, le virus exploite simultanément plusieurs mécanismes pour exprimer un grand nombre de protéines à partir d'une séquence génomique limitée.

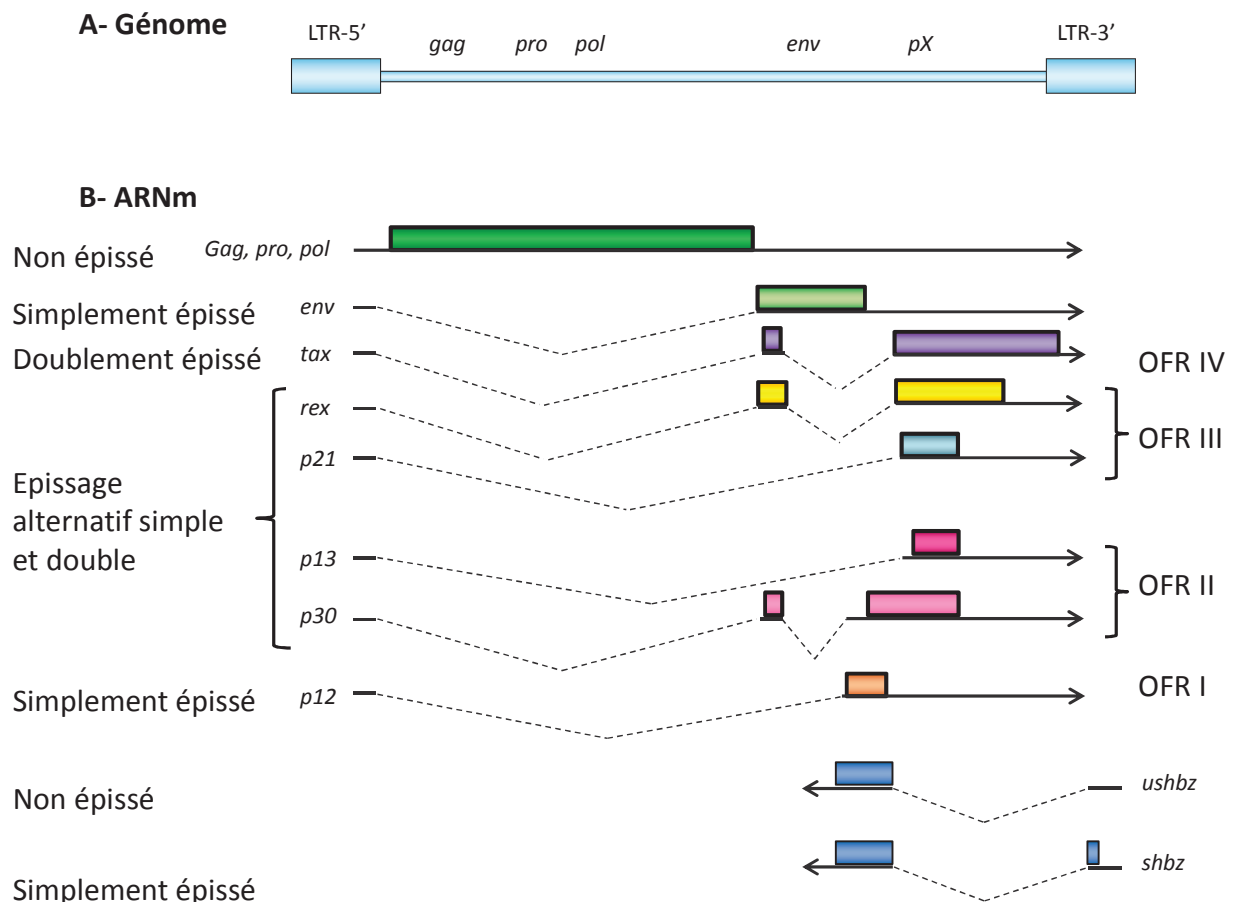


Figure 3 : Génome et transcrits de HTLV-1

(A) Le génome de HTLV-1, composé des gènes *gag*, *pro*, *pol*, *env* et de la région *pX*, est flanqué de deux LTR. (B) Les ARNm viraux codant pour les protéines virales sont représentés. Tous ces ARNm sont sous le contrôle du LTR-5' à l'exception de l'ARNm codant pour HBZ. L'ARNm génomique codé par *gag*, *pro* et *pol* n'est pas épissé. L'ARNm codé par *env* est mono-épissé. Du fait que la région *pX* possède quatre cadres ouverts de lecture (ORF) et que les ARNm correspondant subissent des mécanismes d'épissage complexes, la région *pX* code par son brin positif pour plusieurs protéines accessoires (*p21*, *p13*, *p30*, *p12*) et de régulation (*Tax*, *Rex*). Les ARNm codant pour *Tax*, *Rex* et *p30* sont doublement épissés tandis que ceux codant pour *p21*, *p13* et *p12* sont simplement épissés. De plus, le brin négatif de la région *pX* code pour la protéine HBZ sous le contrôle du LTR-3'. Des formes de HBZ non épissées (*ushbz*) et épissées (*shbz*) ont été décrites (D'après (Matsuoka and Jeang, 2007)).

1-1-2b/ Tropisme de HTLV-1

In vivo, HTLV-1 infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ (Richardson et al., 1990). Cependant, des cellules T CD4⁺CD8⁺ (Ciminale et al., 2000) et CD8⁺ (Hanon et al., 2000b), des monocytes, des cellules B (Koyanagi et al., 1993), des cellules dendritiques (DC

pour dendritic cells) (Jones *et al.*, 2008), des cellules vasculaires endothéliales, des cellules épithéliales des glandes salivaires (Setoyama *et al.*, 1998) et des cellules épithéliales des glandes mammaires (LeVasseur *et al.*, 1998) ont été retrouvés infectés et joueraient le rôle de réservoir viral. Ce tropisme *in vivo* n'est pas retrouvé *in vitro* puisque HTLV-1 infecte *in vitro* un plus grand nombre de types cellulaires.

Des études *in vitro* montrent que HTLV-1 est faiblement infectieux pour les lymphocytes T CD4⁺. Par contre, HTLV-1 est fortement infectieux pour les DC, comme le montre la présence de la protéine virale p19 dans des DC d'origine myéloïde (mDC) ou plasmacytoïde (pDC), 24h après l'infection par HTLV-1 (Jones *et al.*, 2008). Ces données suggèrent également que la forte charge provirale observée chez les patients souffrant d'ATLL résulte de la prolifération des cellules T CD4⁺ infectées plutôt que de nouvelles infections de lymphocytes T CD4⁺ par des particules virales.

D'autres études suggèrent que les thymocytes, précurseurs des cellules T, seraient la cible de l'infection par HTLV-1 très tôt au cours de la vie. En effet, Maguer-Satta *et al.* ont montré que les thymocytes humains matures ou immatures peuvent être infectés par HTLV-1 *in vitro*. L'infection par HTLV-1 perturberait la prolifération et la maturation des thymocytes, favorisant l'émergence de cellules leucémiques (Maguer-Satta *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'expression transitoire de Tax dans des thymocytes humains immatures inhibe l'expression de la chaîne pT α , un des composants du pré-TCR (T-cell receptor), et perturberait le développement des thymocytes (Wencker *et al.*, 2007).

Une autre étude suggère que les cellules souches hématopoïétiques représenteraient la première cible de HTLV-1 ainsi que le réservoir viral. Des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules souches CD34⁺ humaines ont été infectés par HTLV-1 *in vitro*, puis inoculés dans des souris NOD/SCID (non obese diabetic / severe combined immunodeficient) immunodéficientes. Les souris ont par la suite développé une leucémie présentant des caractéristiques proches de l'ATLL et ont montré une forte prolifération de cellules souches humaines infectées dans la moelle osseuse (Banerjee *et al.*, 2010). L'hypothèse avancée est que l'infection par HTLV-1 des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques favoriserait la différenciation du linéage T au détriment du linéage B. Des événements transformants supplémentaires seraient nécessaires pour immortaliser et transformer les cellules T (Banerjee *et al.*, 2010).

Par conséquent, l'infection des précurseurs des cellules T CD4⁺, comme les cellules souches hématopoïétiques ou les thymocytes immatures, pourrait être à l'origine du développement de l'ATLL de nombreuses années après l'infection.

1-1-2c/ Cycle viral de HTLV-1

Entrée du virus dans la cellule cible

Le virion identifie les cellules cibles grâce à ses protéines de surface (gp46) qui reconnaissent les protéines cellulaires de surface. Ces dernières représentent les récepteurs de HTLV-1. Le fait que le virus présente un tropisme plus sélectif *in vivo* alors qu'il peut infecter un grand nombre de types cellulaires *in vitro* représente un des freins à l'identification du ou des récepteurs de HTLV-1. Bien que la nature du ou des récepteurs de HTLV-1 fasse toujours l'objet de controverse, trois (co-)récepteurs sont aujourd'hui retenus : GLUT1 (**glucose transporter 1**), HSPG (**heparan sulfate proteoglycan**) et NRP-1 (**neuropilin-1**) (Ghez et al., 2006; Jones et al., 2005; Lambert et al., 2009; Manel et al., 2003; Pinon et al., 2003). GLUT1 est un transporteur membranaire spécifique du glucose qui est exprimé de manière ubiquitaire. HSPG correspond à une chaîne de polysaccharides sulfatés impliquée entre autres dans la capture de médiateurs solubles (cytokines, chimiokines). La protéine NRP-1, co-récepteur du récepteur 2 VEGF (**vascular endothelium growth factor**), augmente l'affinité de liaison de ce dernier au facteur de croissance VEGF₁₆₅ (**vascular endothelium growth factor F-A165**). Ces trois récepteurs ne fonctionneraient pas de manière indépendante, mais plutôt au sein d'un même complexe (Ghez et al., 2010; Jones et al., 2011) (Figure 4, étapes 1 et 2).

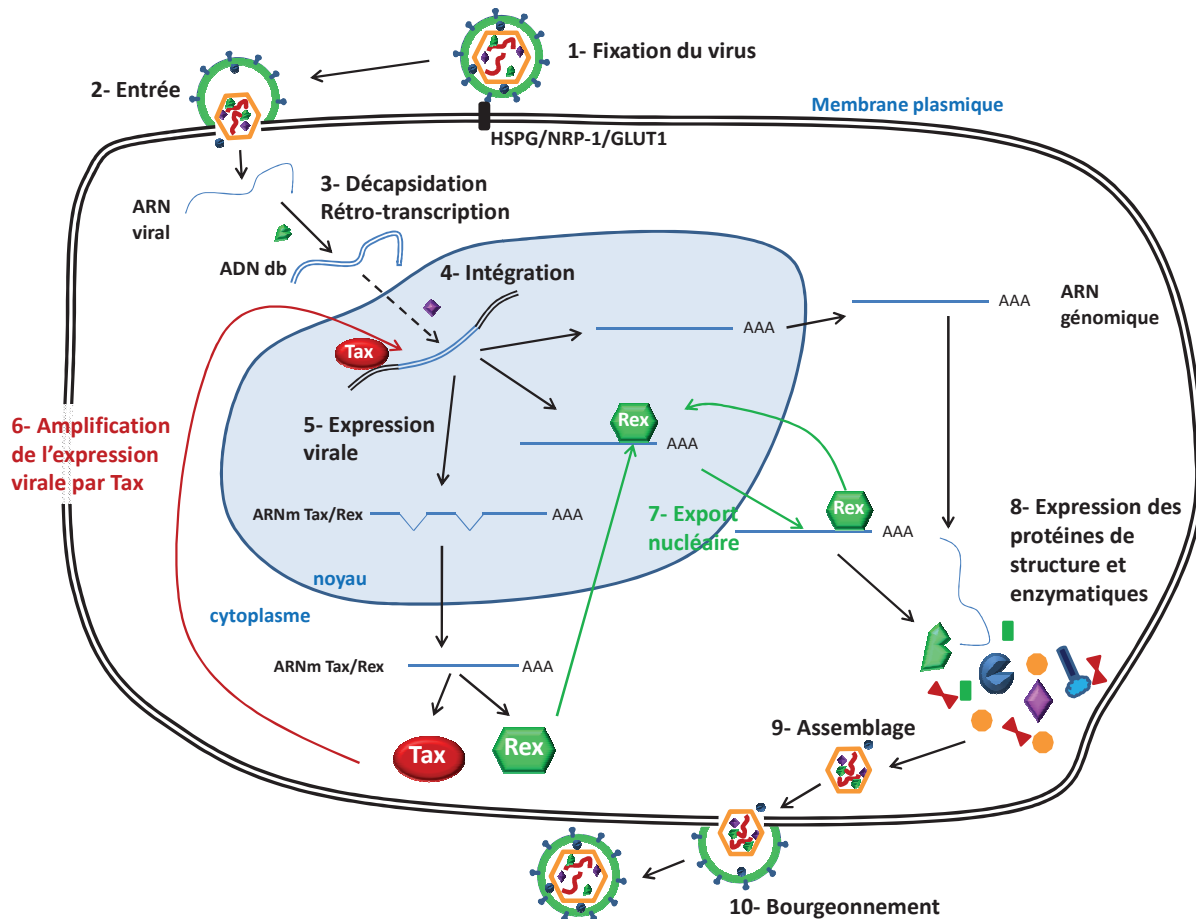


Figure 4 : Représentation schématique du cycle viral de HTLV-1

(1, 2) Le virus HTLV-1 reconnaît des récepteurs cellulaires spécifiques (HSPG, NRP-1 et GLUT1) permettant l'adhésion à la cellule, puis l'entrée dans la cellule cible. (3, 4) Le génome viral est libéré dans le cytoplasme, rétro-transcrit en ADN double brins (ADN db) et intégré dans le génome cellulaire. (5, 6, 7) L'expression du génome viral est activée permettant la synthèse de transcrits viraux. Ce phénomène est augmenté par la protéine Tax qui active le promoteur viral dans le LTR-5' et par la protéine Rex qui favorise l'export des ARNm viraux codant pour les protéines enzymatiques et de structure. (8, 9, 10) Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme et s'assemblent pour former de nouvelles particules virales par bourgeonnement.

Cependant, les récepteurs GLUT1 et HSPG sont exprimés par de nombreux types cellulaires *in vivo* et *in vitro* et ne permettent pas d'expliquer le tropisme limité de HTLV-1 observé *in vivo*. En revanche, le récepteur NRP-1 est notamment exprimé par les cellules T CD4⁺ activées, les cellules endothéliales, les pDC et la majorité des cellules tumorales *in vivo*. De plus, puisque la transformation cellulaire conduit à une surexpression de NRP-1, la majorité des lignées cellulaires exprime NRP-1 *in vitro*. Ainsi, parmi les récepteurs de HTLV-1 cités ci-dessus, le récepteur NRP-1 serait responsable du tropisme de HTLV-1 observé *in vivo*.

En accord avec le fait que le virion de HTLV-1 libre soit faiblement infectieux pour les lymphocytes T CD4⁺, l'infection de HTLV-1 par contact cellule infectée/cellule non infectée est 10 000 fois plus efficace que l'infection cellule/virion (*Mazurov et al., 2010*). En particulier, un modèle de transmission virale en deux temps par les pDC aux cellules T CD4⁺ a été proposé. Dans un premier temps, les pDC captureraient les virions et les transfèreraient aux cellules T CD4⁺ (*trans*-infection). Dans un second temps, les cellules T CD4⁺ sont essentiellement infectées par de nouveaux virus synthétisés par les cellules pDC (*cis*-infection) (*Jones et al., 2008*). Le rôle des récepteurs HSPG et NRP-1 dans la transmission du virus des pDC aux cellules T CD4⁺ a été démontré. Une co-culture de pDC exposées à HTLV-1 et de cellules T naïves induit une rapide augmentation de l'expression de HSPG et de NRP-1 à la surface des cellules T autologues au repos (*Jones et al., 2008*). Par conséquent, le contact de cellules infectées, comme des pDC, avec des cellules T CD4⁺ au repos induit l'expression des récepteurs de HTLV-1 par la cellule T non infectée.

L'infection virale par contact d'une cellule à une autre s'effectuerait via des structures particulières protégeant les particules virales. En particulier, la formation d'une synapse virologique permet de concentrer les particules virales au sein d'une fente synaptique, empêchant la dissémination et facilitant la transmission à la cellule cible (*Majorovits et al., 2008; Nejmeddine et al., 2009*). Ces structures auraient pour fonction de protéger les particules virales du système immunitaire. Plus récemment, l'existence de biofilm viral a été proposée (*Pais-Correia et al., 2010*). Dans ces structures, les particules virales nouvellement formées sont séquestrées dans une matrice extracellulaire d'hydrocarbure, accélérant la propagation virale lors de contacts avec des cellules cibles.

Intégration du provirus

Une fois le virus entré dans la cellule hôte, son contenu est libéré dans le cytoplasme et son ARN est transcrit en ADN double brin via la reverse-transcriptase. L'intégrase permet ensuite l'intégration du génome viral dans un chromosome de la cellule hôte de manière aléatoire. Le virus intégré est appelé provirus (Figure 4, étapes 3 et 4).

Expression du génome viral

Suite à l'infection par HTLV-1, la machinerie de transcription et de traduction de l'hôte permet l'expression du génome viral (Figure 4, étape 5). Le premier ARNm viral transcrit est celui de *tax/rex* qui code pour les protéines Tax et Rex suite à un épissage alternatif (Rende et al., 2011). HTLV-1 régule sa propre expression au niveau transcriptionnel via la protéine virale Tax et au niveau post-transcriptionnel via la protéine virale Rex.

Une des fonctions principales de Tax est d'activer l'expression du génome viral. Tax peut se lier aux facteurs de transcription cellulaires et faciliter leur recrutement au niveau de sites spécifiques TxRE (**T**ax **r**esponsive **e**lement) dans le LTR-5'. Le complexe Tax/facteurs de transcription recrute ensuite des cofacteurs de transcription et les enzymes de transcription (Figure 4, étape 6 et chapitre 2-2-1a). Ainsi, Tax amplifie l'expression des protéines virales.

Rex se lie aux séquences RxRE (**R**ex-responsive **e**lement) présentes en 3' de tous les ARNm viraux. Rex possède une séquence NES (**n**uclear **e**xport **s**ignal) permettant d'exporter les ARNm viraux dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines. Via ses séquences NLS (**n**uclear **l**ocalization **s**ignal) et NES, Rex a la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Baydoun et al., 2008). De ce fait, Rex accélère le processus d'export nucléocytoplasmique, empêchant le recrutement des facteurs d'épissage ou de rétention nucléaire au niveau des ARNm viraux. Rex protège ainsi les ARNm non épissés *gag*, *pro*, *pol* ou mono-épissé *env* d'un double épissage, de la dégradation ou de la séquestration nucléaire. Ainsi, Rex favorise la production de virions au détriment de la production des protéines accessoires ou de régulation (Figure 4, étapes 7 et 8).

Par conséquent, les protéines régulatrices Tax et Rex, en accélérant l'expression du génome viral et la production des protéines virales de structure et enzymatiques, jouent un rôle central dans le cycle répliatif. De plus, l'expression du génome viral serait amplifiée par un faible niveau de p30 qui active le LTR-5' (Bai et al., 2010; Baydoun et al., 2008). Comme la protéine p30 est synthétisée à partir d'un ARNm doublement épissé, la faible expression de p30 serait favorisée par l'activité de Rex qui limite la présence dans le noyau de l'ARNm viral codant pour p30. De même, p12 active des voies de survie, comme les voies Jak/STAT (**J**anus **t**yrosine **k**inase/**s**ignal **t**ransducer of **a**ctivated **T** cells) et NFAT (**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells), conduisant indirectement à l'activation de Tax et des facteurs de transcription du LTR-5' et donc à l'amplification de l'expression du génome viral (Van Prooyen et al., 2010). Ainsi, certaines protéines virales de HTLV-1 favorisent la production de particules virales.

Formation de nouvelles particules virales

L'assemblage des protéines virales de structure et enzymatiques et le bourgeonnement aboutissent à la formation de nouvelles particules virales (Figure 4, étapes 9 et 10). Ces particules seraient emprisonnées dans le biofilm viral pour être transmises par contact cellulaire à de nouvelles cellules cibles non infectées (Pais-Correia et al., 2010).

Il a été montré que la protéine virale Tax favorise l'expression de la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) à la membrane plasmique et contrôle la polarisation de MTOC (microtubule organizing centre). ICAM-1 est une molécule d'adhésion impliquée dans les étapes précoces de la formation de la synapse virologique. Les MTOC, zones où s'organisent les microtubules, sont orientés de la cellule infectée par HTLV-1 vers le site de contact avec une cellule non infectée. Ainsi, Tax facilite la mise en place de la synapse virologique (Nejmeddine et al., 2009). De même, la protéine p8, produit de clivage de p12, serait impliquée dans l'établissement des contacts entre les cellules T et augmenterait le transfert du virus vers les cellules T non infectées (Van Prooyen et al., 2010). Par conséquent, des protéines virales aussi bien de régulation que accessoires favorisent la transmission du virus aux cellules non infectées.

Comme cité précédemment HTLV-1 est un rétrovirus complexe qui possède en plus des gènes classiques *gag*, *pro*, *pol* et *env* une région codant pour des protéines accessoires et régulatrices, qui jouent un rôle dans le contrôle du cycle viral, mais aussi dans le processus d'oncogenèse lié à l'infection par HTLV-1. Certains rétrovirus oncogènes s'intègrent en amont d'un gène codant pour un oncogène cellulaire et activent son expression. A l'inverse, HTLV-1 ne s'intègre pas de manière préférentielle dans le génome humain et les sites d'intégration ne semblent pas liés au développement d'une pathologie en particulier. D'autres virus oncogènes codent directement pour des protéines virales oncogéniques comme les homologues aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Encore une fois, HTLV-1 se distingue de ces virus car son génome ne code pas pour un homologue d'une protéine oncogène cellulaire. Toutefois, HTLV-1 code pour une protéine atypique, Tax, dont le rôle dans la leucémogenèse a été démontré, et pour une protéine HBZ, dont certaines

fonctions miment les facteurs cellulaires de la famille AP-1 et qui serait impliquée dans le maintien du phénotype tumoral. Ces deux protéines virales semblent complémentaires au cours du processus tumoral. Alors que Tax est principalement exprimée au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL, HBZ semble jouer un rôle essentiel au cours des étapes tardives.

Avant de présenter un modèle de développement de l'ATLL, les fonctions des protéines virales Tax et HBZ seront abordées.

1 – 2/ L'ONCOPROTEINE VIRALE TAX

La protéine virale Tax, également appelée p40, est une des premières protéines virales exprimées suite à l'intégration du provirus dans le génome cellulaire. La première fonction de Tax est d'amplifier l'expression des gènes viraux sous le contrôle du LTR-5'. De plus, la protéine Tax semble être fortement impliquée dans les mécanismes initiant la leucémogénèse. Par sa capacité à interagir avec un grand nombre de protéines cellulaires, Tax module de nombreux mécanismes cellulaires comme l'activation de la prolifération, le maintien de la survie cellulaire et la surveillance de l'intégrité génomique. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'inhibition de l'apoptose des cellules T infectées par HTLV-1, une des conséquences de l'activation des voies de survie par Tax.

1-2-1/ Mécanismes d'action de Tax

1-2-1a/ Activation de l'expression du génome viral

Tax reconnaît trois séquences de régulation TxRE (**T**ax **r**esponsive **e**lement) de 21 pb au sein du LTR-5'. Ces séquences contiennent chacune un site vCRE (**v**irale **c**yclic **A**MP **r**esponse **e**lement) flanqué d'une région riche en GC. Les sites vCRE sont reconnus par les

facteurs de la famille AP-1 (**activator protein 1**), dont essentiellement CREB (**cAMP responsive element binding protein**). Tax ne se lie pas directement à l'ADN, mais favorise le recrutement des facteurs de transcription qui reconnaissent ces séquences TxRE. Une analyse d'immunoprécipitation de la chromatine dans une lignée cellulaire T infectée par HTLV-1 (SLB-1) a révélé la présence des facteurs de transcription de la famille AP-1, tels que CREB, CREB-2 (**cAMP responsive element binding protein 2**), ATF-1 (**activating transcription factor 1**), ATF-2 (**activating transcription factor 2**), c-Fos et c-Jun, ainsi que des cofacteurs p300 et CBP (**CREB-binding protein**) au niveau du promoteur de HTLV-1 (*Lemasson et al., 2002*). Toutefois, CREB semble être le facteur de transcription principal du LTR-5' (*Ching et al., 2004*). Ainsi, Tax forme des dimères avec CREB et, en favorisant la phosphorylation de ce dernier, stabilise le complexe Tax/CREB/ADN (*Kim et al., 2007*). Ce complexe recrute ensuite des facteurs de remodelage de la chromatine permettant l'acétylation, comme CBP/p300, et la méthylation, comme CARM1 (**coactivator-associated arginine methyltransferase 1**), des histones (*Jeong et al., 2006*). Ces mécanismes conduisent au désassemblage des nucléosomes par des protéines de modelage des histones (Nap1, SWI/SNF), libérant ainsi l'accès de l'ADN à la machinerie de transcription classique (*Jeong et al., 2006; Nyborg et al., 2010*). Par ailleurs, le domaine C-terminal de Tax interagit directement avec TBP (**TATA box binding protein**) permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (*Boxus et al., 2008*) (Figure 4, étape 6). Ces données indiquent que Tax joue un rôle direct sur la transcription. Par conséquent, en activant la transcription du génome viral, Tax joue un rôle essentiel dans le processus du cycle viral.

1-2-1b/ Des fonctions multiples en lien avec la structure et la localisation cellulaire de Tax

La *trans*-activation du LTR-5' par Tax illustre la capacité de la protéine virale à activer l'expression de gènes en modulant l'activité de nombreux facteurs et co-facteurs cellulaires (CBP/p300, facteurs de modelage de la chromatine...) par des interactions protéines-protéines. Cette propriété confère à Tax la capacité à réguler, non seulement l'expression du génome viral, mais également celle de nombreux gènes cellulaires, expliquant l'activité

pléiotropique de Tax. Comme dit précédemment, Tax ne se lie pas lui-même à l'ADN, mais à des facteurs de transcription qui se lient à des sites consensus spécifiques au niveau de promoteurs cellulaires. Ainsi, dans les cellules infectées par HTLV-1, Tax agit à deux niveaux en modulant à la fois l'expression et l'activité de protéines cellulaires. Au niveau transcriptionnel, Tax régule l'activité de facteurs de transcription et de co-facteurs, modulant l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose. Au niveau post-traductionnel, Tax interagit directement avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation de survie, dans le contrôle du cycle cellulaire, dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans le transport cellulaire, et avec des protéines du cytosquelette et du protéasome (*Boxus and Willems, 2009*), modulant positivement ou négativement leur activité.

Plusieurs domaines d'interaction confèrent à la protéine Tax la capacité à interagir avec des protéines cellulaires de nature et de fonction différentes (*Figure 5*). La partie N-terminale de Tax contient un motif en doigt de zinc qui s'associe à de nombreux facteurs de transcription, dont CREB, des nucléoprotéines ou encore les sous-unités du protéasome. Le domaine central contient une région nécessaire à la formation de dimères grâce à deux motifs de type leucine-zipper (LZD). Ce domaine central est nécessaire à l'interaction avec les membres de la voie NF- κ B, les sous-unités du protéasome et les protéines contenant des domaines « coiled-coil ». La partie C-terminale contient un domaine d'activation de la protéine Tax. Cette partie interagit entre autres avec les protéines contenant des domaines PDZ (PSD-95 pour Post Synaptic Density de 95 kDa, DLG pour *Drosophila melanogaster* disc large protein, ZO-1), impliquées dans la transduction du signal et les jonctions cellulaires (*Boxus and Willems, 2009*).

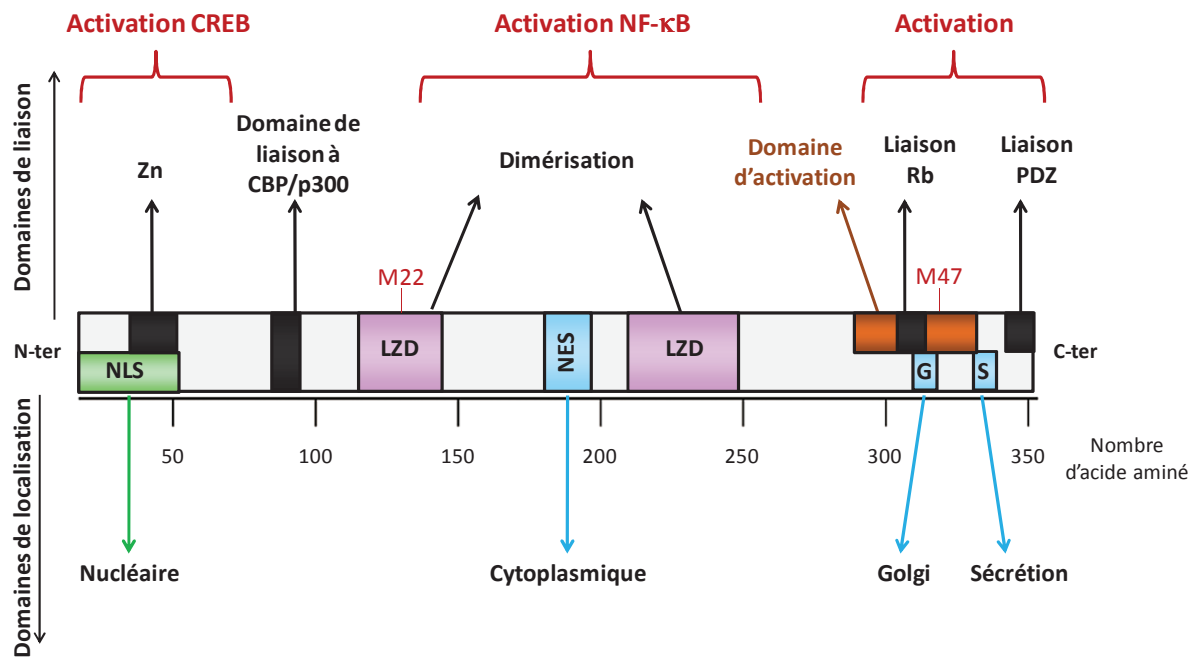


Figure 5 : Schéma représentant la structure de Tax

Tax est une protéine de 353 acides aminés et de 40 kDa. Les domaines Zn (doigt de zinc), leucines zipper LZD, de liaison à CBP/p300, de liaison aux protéines Rb ou aux protéines à domaine PDZ déterminent les fonctions de Tax. Les domaines NLS, NES, G (localisation au niveau du Golgi) et S (motif de sécrétion) régulent la localisation de Tax. N-ter = partie N-terminale ; C-ter = partie C-terminale, M22 = mutant T130A/L131S, décrit comme déficient pour la voie NF-κB ; M47 = mutant L319R/L320S, décrit comme déficient pour CREB (adapté de (Boxus et al., 2008; Satou and Matsuoka, 2010)).

La structure de Tax détermine aussi sa localisation cellulaire. En accord avec ses fonctions multiples, Tax est retrouvée à la fois dans le noyau, dans le cytoplasme et est sécrétée. En effet, un domaine NLS permet la translocation de Tax dans le noyau où elle est principalement observée au niveau de foyers nucléaires et de corps nucléaires (Boxus and Willems, 2009). Tax est exportée dans le cytoplasme via une séquence NES où elle est retrouvée dans des corps péri-nucléaires, adjacents au centrosome et au MTOC, en association étroite avec le compartiment *cis* du Golgi (Nejmeddine et al., 2005). Elle est également présente au niveau des organelles associées à la sécrétion cellulaire, comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, grâce à un motif de localisation au niveau du Golgi. Enfin, un domaine de sécrétion permet à Tax de se comporter comme une cytokine extracellulaire (Boxus and Willems, 2009) (Figure – 5). Nous verrons que les modifications

post-traductionnelles de Tax modulent également sa localisation cellulaire et sa fonction (chapitre 2-2-2c).

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressée en particulier aux voies de survie NF- κ B et AP-1. Ces deux voies sont activées par Tax et illustrent la capacité de cette protéine virale à moduler des facteurs cellulaires.

1-2-2/ Activation de la voie NF- κ B par Tax

1-2-2a/ Description de la voie NF- κ B

L'activation de la voie NF- κ B est induite par des pathogènes viraux ou bactériens, par des inducteurs de stress (ionisation, radiation, ultraviolet) ou encore par des cytokines pro-inflammatoires via l'activation de récepteurs membranaires.

Les facteurs de transcription nucléaires NF- κ B sont au nombre de 5 : NF- κ B1 (ou p105/p50), NF- κ B2 (ou p100/p52), RelA (ou p65), RelB et c-Rel. Les protéines RelA, RelB et c-Rel sont directement exprimées sous forme de facteurs transcriptionnellement actifs. En revanche, p50 et p52 sont synthétisés sous forme de précurseurs cytosoliques inactifs, respectivement p105 et p100, et deviennent fonctionnels suite au clivage protéolytique de leur partie C-terminale. Dans leur partie N-terminale, chacun des effecteurs possède un domaine RHD (pour **Rel-homology domain**) d'environ 300 acides aminés permettant la reconnaissance et la fixation à des séquences spécifiques dans les promoteurs de leurs gènes cibles. Ces domaines RHD sont impliqués non seulement dans la localisation nucléaire et la liaison à des facteurs cytosoliques (tel que I κ B) mais également dans la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères, indispensable à leur activité transcriptionnelle. Les protéines RelA, RelB et c-Rel possèdent un domaine additionnel de *trans*-activation (TDA pour **C-terminal trans-activation domain**) permettant d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle de base. Les protéines p50 et p52, dépourvues de domaine TDA, doivent former des dimères

avec les autres membres de la famille NF- κ B pour être transcriptionnellement actives (*Baud and Jacque, 2008; Peloponese et al., 2006; Sun and Yamaoka, 2005; Vallabhapurapu and Karin, 2009; Nishikori et al., 2005*).

Deux voies NF- κ B ont été décrites, la voie classique ou canonique et la voie alterne ou non canonique. Ces deux voies divergent par les membres qui les régulent.

La voie NF- κ B classique s'applique majoritairement aux dimères RelA/p50. Dans le cytoplasme des cellules au repos, les facteurs NF- κ B sont associés aux protéines inhibitrices de kappa B (I κ B pour inhibitor of κ B) : I κ B α , I κ B β , I κ B δ , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3. En masquant le NLS localisé dans le domaine RHD, ces I κ B régulent la localisation subcellulaire des protéines NF- κ B, inhibant ainsi leur translocation dans le noyau (Figure 6A). Les protéines I κ B possèdent différentes affinités et spécificités pour les dimères NF- κ B. Par exemple, I κ B β inhibe l'hétéro-dimère p50/RelA plus efficacement que les complexes p50/RelB ou p50/c-Rel. Par opposition, I κ B α reconnaît les trois complexes de la même manière (*Peloponese et al., 2006*).

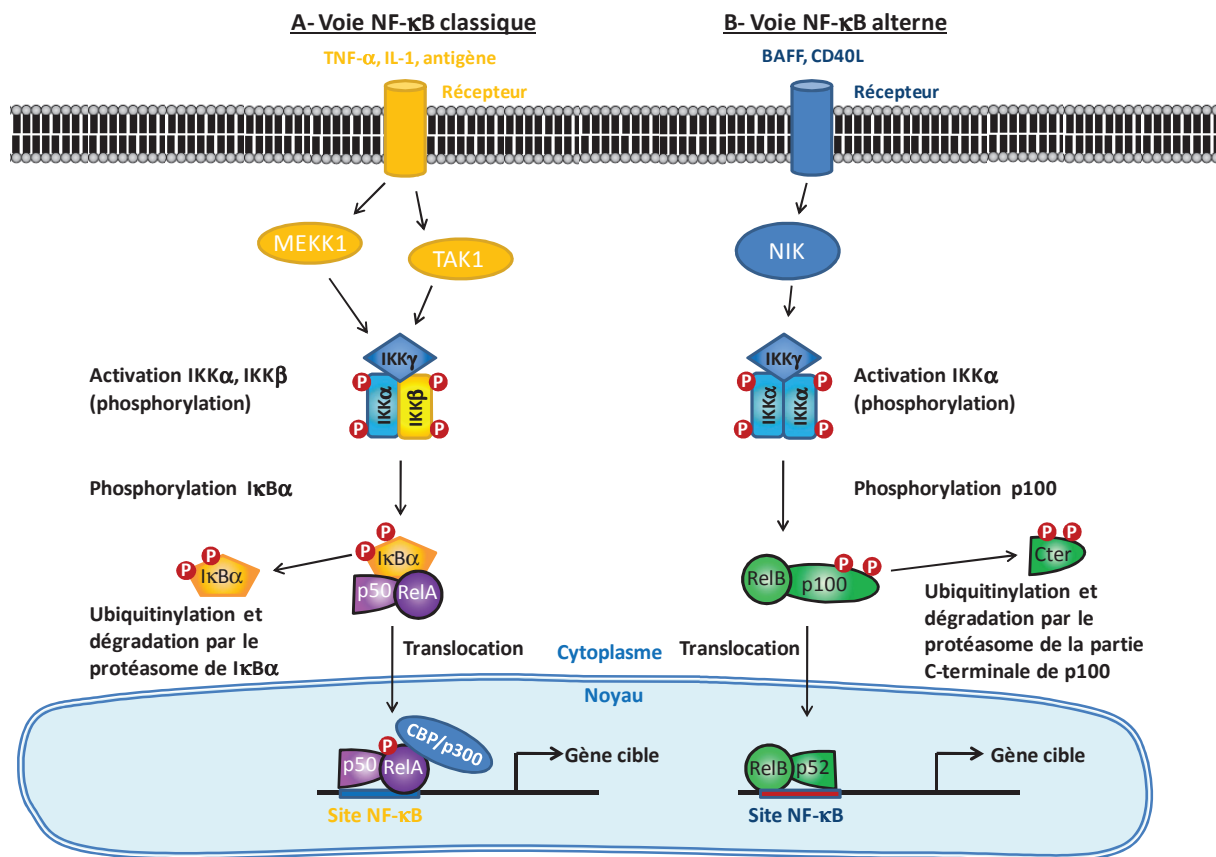


Figure 6 : Les voies de signalisation NF-κB classique et alterne

(A) Mécanisme d'activation de la voie NF-κB classique. Dans les cellules aux repos, les dimères NF-κB (RelA/p50) sont inhibés par les IκB (Inhibiteurs de κB). L'activation des récepteurs comme ceux du TNF-α et de l'IL-1 induit la phosphorylation des protéines IκB par le complexe IKKα/Iκkβ/IKKγ (kinases des IκB). Les IκB sont ensuite ubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S. Les dimères NF-κB (RelA/p50) ainsi libérés sont transloqués dans le noyau et activent la transcription de leurs gènes cibles. **(B) Mécanismes d'activation de la voie NF-κB alterne.** Dans les cellules aux repos, le précurseur p100 se lie aux facteurs NF-κB et les séquestre dans le cytoplasme. L'activation des récepteurs de la famille TNFR comme BAFFR et CD40 induit l'activation de NIK (NF-κB-inducing kinase). La formation du complexe NIK-IKKα-p100 induit la phosphorylation et la polyubiquitination de la partie C-terminale (Cter) de p100. Le précurseur p100 est ensuite clivé en p52, générant des dimères RelB/p52 fonctionnels qui activent la transcription de leurs gènes cibles. MEKK1 = mitogen-activated protein/ERK kinase kinase 1; TAK1 = transforming growth factor β (TGF-β)-activated kinase; PP2A = serine/threonine protein phosphatase 2A ; PI3K/Akt = phosphatidylinositol 3-kinase/proteine kinase B d'après (Boxus et al., 2008; Peloponese et al., 2006; Shembade and Harhaj, 2010).

En réponse à des stimuli, dont l'engagement du TCR ou des récepteurs aux cytokines TNF-α et IL-1, des enzymes (MEKK1, TAK1, PP2A (serine/threonine protéine kinase 2A), PI3K/Akt...) phosphorylent et activent les IκB kinase (IKK). Les protéines IKK forment un

complexe composé de trois sous-unités : deux sous-unités enzymatiques IKK α et IKK β et la sous-unité régulatrice IKK γ (ou encore NEMO pour **NF- κ B essential modulator**) (Figure 6A). Le complexe IKK activé phosphoryle et inhibe les protéines inhibitrices I κ B. La phosphorylation des protéines I κ B conduit à leur ubiquitinylation, puis à leur dégradation par le protéasome 26S. Leur domaine NLS ainsi révélé, les effecteurs NF- κ B migrent vers le noyau.

La voie NF- κ B alterne se distingue de la voie NF- κ B classique puisque cette voie n'implique ni les protéines I κ B, ni IKK β , mais nécessite l'activation de NIK (**NF- κ B-inducing kinase**). La voie alterne s'applique principalement à RelB. Dans les cellules au repos, le précurseur p100 se lie aux facteurs NF- κ B pour former des complexes cytoplasmiques (RelB/p50/p100, RelB/p100) inactifs. p100 possède des séquences similaires aux séquences inhibitrices des protéines I κ B dans sa partie C-terminale permettant de séquestrer les facteurs NF- κ B dans le cytoplasme (Figure 6B).

L'activation de récepteurs de la famille TNFR, comme BAFFR (**B cell-activating factor receptor**) ou CD40, induit l'activation de NIK. La formation du complexe NIK/IKK α /p100 induit la phosphorylation des séquences inhibitrices de p100 par IKK α . L'ubiquitinylation et la dégradation de la partie C-terminale de p100 révèle un complexe (RelB/p52, RelB/p50) actif capable de migrer dans le noyau (Figure 6B).

Une fois dans le noyau, les facteurs NF- κ B induisent l'expression de leurs gènes cibles, dont celui de I κ B α . Ce dernier, ayant la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, ramène et séquestre les facteurs NF- κ B dans le cytoplasme. Ce rétrocontrôle négatif est indispensable à la répression de l'activité de la voie NF- κ B et au retour à un état d'activité basale de la cellule. Dans le noyau, l'activité de RelA est accrue par une phosphorylation au niveau du domaine RHD, favorisant sa capacité à former des dimères et à se fixer à l'ADN, ou au niveau du domaine TAD augmentant son activité transcriptionnelle. La phosphorylation et l'acétylation de RelA répriment sa capacité à interagir avec I κ B α augmentant le temps d'action de RelA dans le noyau.

Les gènes cibles de la voie NF- κ B sont impliqués dans des fonctions cellulaires majeures, telles que la survie (Bcl-x_L, c-FLIP), la prolifération (IL-2, cycline D1), la

différenciation et l'activation cellulaire (*Peloponese et al., 2006; Sun and Yamaoka, 2005; Nishikori et al., 2005*).

1-2-2b/ Activation de la voie NF- κ B par Tax

Une activation constitutive de la voie NF- κ B a été décrite dans les cellules T infectées par HTLV-1 (*Hironaka et al., 2004; Mori et al., 1999*). Nous allons voir que Tax joue un rôle majeur dans l'activation de cette voie. En effet, des expériences de gel retard ont montré l'augmentation de l'activité NF- κ B dans des extraits nucléaires de tumeurs issues de souris transgéniques exprimant Tax (*Portis et al., 2001*). Ces données montrent clairement que Tax active la voie NF- κ B *in vivo*. Des études *in vitro* ont révélé la capacité de Tax à activer les voies NF- κ B classique et alterne à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme.

Dans le noyau, Tax active la voie NF- κ B au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Tax induit l'expression constitutive des facteurs RelA, c-Rel, p50 et p52 dans la lignée cellulaire T Jurkat (*Arima et al., 1991*). Tax augmente l'activité de RelA en induisant sa phosphorylation sur les Ser529 et Ser536 (*O'Mahony et al., 2004*). Enfin, Tax colocalise dans les corps nucléaires avec RelA (*Bex et al., 1998*), le cofacteur CBP/p300 et l'ARN polymérase II et active la transcription des gènes régulés par NF- κ B (Figure 7).

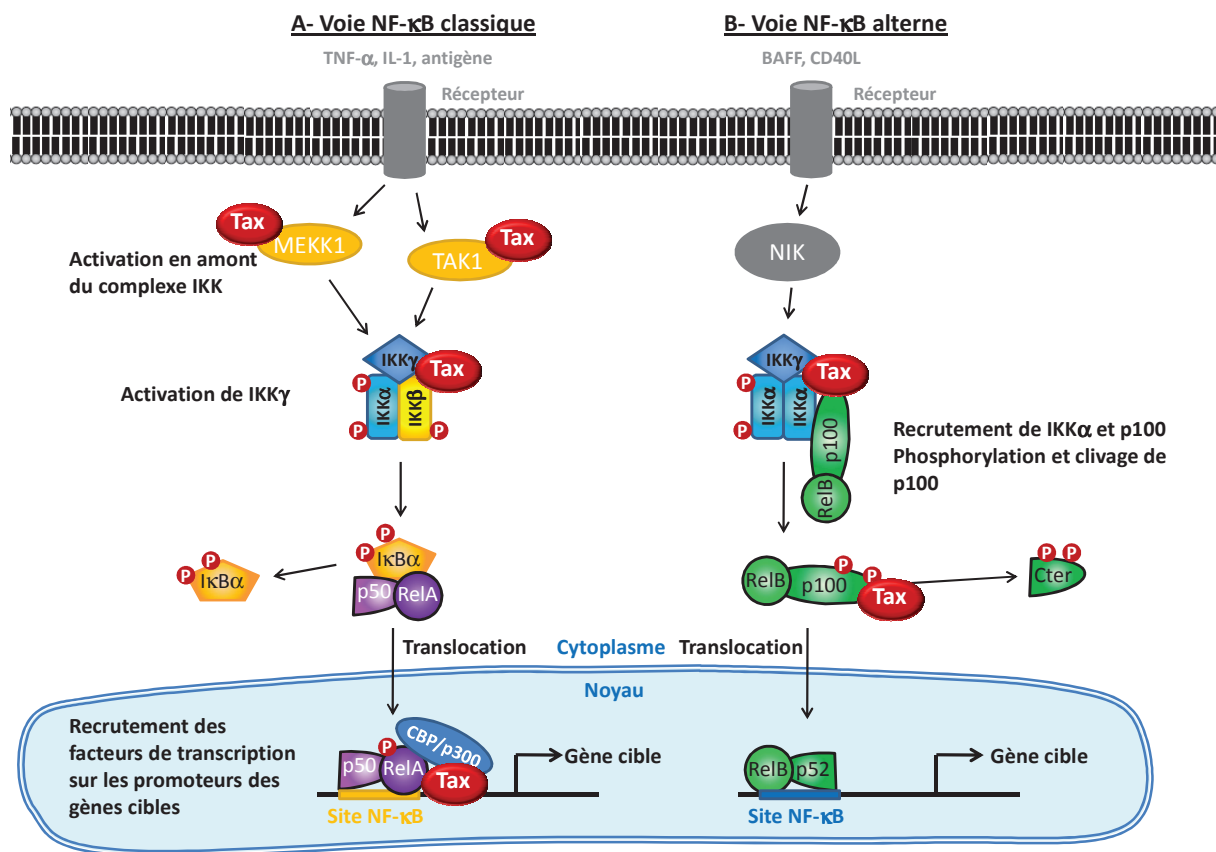


Figure 7 : Dérégulation des voies de signalisation NF-κB alterne et classique par la protéine virale Tax dans le cytoplasme et dans le noyau

(A) Tax active la voie NF-κB classique. Tax active les régulateurs en amont du complexe IKK, court-circuitant ainsi l'engagement des récepteurs cellulaires. L'activation du complexe IKK favorise la phosphorylation constitutive des IκB et leur dégradation. Les facteurs NF-κB ainsi libérés sont transloqués dans le noyau où ils sont recrutés par Tax sur les sites consensus de leurs gènes cibles.

(B) Tax active la voie NF-κB alterne. Tax recrute IKKα et p100, favorisant le clivage de ce dernier et la libération des facteurs NF-κB.

Dans le cytoplasme, Tax active à la fois la voie NF-κB classique et alterne.

Tax module les régulateurs en amont de la voie NF-κB classique. Tax réprime les régulateurs négatifs des IKK comme PP2A (*Fu et al., 2003*) et active les régulateurs positifs des IKK tels que MEKK1, TAK1, Akt, TAB2 (**TAK1-binding protein 2**), NRP (**NEMO-related protein**) (*Avesani et al., 2010; Journo et al., 2009; Peloponese et al., 2006*). Par conséquent, Tax court-circuite l'engagement des récepteurs en surface (**Figure 7A**). De plus, Tax inhiberait les PIP₃ (**p**hosphatidylinositol (3,4,5)-**t**riphosphate) phosphatases PTEN (**p**hosphatase and **t**ensin homolog deleted on chromosome **10**) et SHIP-1 (**S**rc **h**omology 2 domain containing inositol **p**olyphosphate phosphatase-**1**) ayant pour conséquence l'activation de la cascade PI3K, en amont de la voie NF-κB (*Fukuda et al., 2009*). Tax provoque également la

phosphorylation et par conséquent la dégradation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ (Rousset *et al.*, 1996; Sun and Ballard, 1999). Cet effet pourrait être médié par $\text{IKK}\gamma$ puisque Tax est incapable d'activer la voie NF- κB dans des cellules Jurkat ou des fibroblastes d'embryon de souris (MEF pour **m**ouse **e**mbryonic **f**ibroblaste) déficients pour $\text{IKK}\gamma$ (Harhaj *et al.*, 2000). Tax se lie directement à $\text{IKK}\gamma$ via son domaine leucine zipper (Harhaj and Sun, 1999; Kfoury *et al.*, 2008) (Figure 7A).

Dans de nombreuses lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 (Xiao *et al.*, 2001) et dans des lignées dérivées d'ATLL (Hironaka *et al.*, 2004), p100 est clivé sous la forme active p52, indiquant que la voie NF- κB alterne est activée. En recrutant $\text{IKK}\alpha$ et p100, Tax favorise la phosphorylation, l'ubiquitylation et le clivage de la partie C-terminale de p100, conduisant à l'activation de la voie NF- κB alterne (Figure 7B).

En conclusion, Tax active à la fois les voies NF- κB classique et alterne à différents niveaux. Ces données permettent d'expliquer l'activation constitutive de la voie NF- κB dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 (Hironaka *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 1999). Toutefois, Tax est faiblement exprimée voire indétectable au cours des étapes tardives de l'ATLL et une activation constitutive de la voie NF- κB a été détectée chez des patients atteints d'ATLL (Mori *et al.*, 1999). De plus, les deux voies NF- κB classique et alterne sont activées dans des lignées cellulaires d'ATLL n'exprimant pas Tax (Hironaka *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que des mécanismes d'activation de la voie NF- κB se mettent en place indépendamment de Tax au cours du développement de l'ATLL. Cependant, ces mécanismes sont encore indéterminés. Des altérations génétiques ou une surexpression du récepteur cellulaire CD30 (Higuchi *et al.*, 2005) représenteraient des éléments de réponse.

1-2-2c/ Effets des modifications post-traductionnelles de Tax sur l'activation de la voie NF- κB

Les modifications post-traductionnelles sont connues pour réguler la stabilité, l'activité, la localisation cellulaire ou la dégradation de nombreuses protéines. Ces dernières

années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la phosphorylation, de l'ubiquitination, de la sumoylation et même de l'acétylation dans la régulation de l'activité de Tax, et notamment dans sa capacité à activer la voie NF- κ B (*Lodewick et al., 2011*).

La « carte de phosphorylation » de Tax, obtenue par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) révèle de nombreux sites de phosphorylation potentiels capables de réguler sa fonction (*Durkin et al., 2006*). En particulier, la phosphorylation de Tax sur les sérines 300 et/ou 301 semble jouer un rôle essentiel dans l'activation de Tax. En effet, cette phosphorylation est nécessaire à l'activation de gènes par Tax via les voies CREB/ATF et NF- κ B et à la localisation de Tax dans les corps nucléaires (*Bex et al., 1999*).

Tax possède 10 lysines dont 5 sont préférentiellement ubiquitinylées (*Lamsoul et al., 2005*). Il a d'abord été décrit que la poly-ubiquitination de Tax permettait sa liaison avec le protéasome sans induire sa dégradation (*Chiari et al., 2004*) et que la mono-ubiquitination de Tax, en présence d'une surexpression de l'ubiquitine, réprimait son activité transcriptionnelle au niveau du LTR-5' de HTLV-1 et d'un promoteur artificiel contenant des sites NF- κ B (*Peloponese et al., 2004*). Cependant, cette dernière étude est aujourd'hui controversée. En effet, il a été récemment démontré que l'ubiquitination de Tax est nécessaire à sa rétention dans le cytoplasme permettant ainsi l'activation du complexe IKK (*Lodewick et al., 2009*) et la translocation nucléaire de RelA (*Lodewick et al., 2009; Nasr et al., 2006*).

L'ubiquitination de Tax sur les lysines 7 et 8 (en position 280 et 284 de la séquence d'acides aminés) entre en compétition avec la sumoylation. Cette sumoylation est essentielle à la localisation de Tax dans le noyau et à la formation de corps nucléaires contenant p50, RelA, CBP/p300, et l'ARN polymérase II (*Lodewick et al., 2009; Nasr et al., 2006*). Ainsi, la sumoylation et l'ubiquitination de Tax, dans le noyau et le cytoplasme, sont nécessaires pour une activation optimale de la voie NF- κ B par Tax.

Enfin, Tax peut être acétylée par le co-activateur de transcription p300 sur la lysine 10 (en position 346) dans le noyau (*Lodewick et al., 2009*). Les auteurs suggèrent que l'acétylation de Tax stabilise le complexe d'activation de la transcription. Par ailleurs, la sumoylation, qui est nécessaire au recrutement de RelA dans les corps nucléaires formés par Tax, favorise l'acétylation de Tax et stabilise ainsi le complexe de transcription (*Lodewick et al., 2009; Nasr et al., 2006*).

En conclusion, l'étude de la régulation de la voie NF- κ B par Tax témoigne de la complexité d'action de Tax. En effet, Tax module à la fois l'expression et l'activité des facteurs de la voie NF- κ B quel que soit leur localisation cellulaire. Tax est capable de court-circuiter l'activation des récepteurs membranaires, d'activer des activateurs ou d'inhiber des répresseurs de la voie NF- κ B et d'induire des modifications post-traductionnelles de certaines protéines, comme le clivage de p100. Enfin, les modifications post-traductionnelles de Tax déterminent sa localisation cellulaire et sa fonction. La phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation et l'acétylation de Tax semblent nécessaires à l'activation maximale de la voie NF- κ B par Tax. L'impact de ces modifications post-traductionnelles de Tax sur les autres activités de la protéine virale n'a pas été étudié.

1-2-3/ Activation de la voie AP-1 par Tax

Les facteurs AP-1 sont répartis en familles : les familles Jun pour **jun** proto-oncogène (c-Jun, JunB et JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2...), CREB/ATF pour **c**AMP responsive **e**lement **b**inding protein/**a**ctivating transcription factor (CREB, ATF1, ATF2, ATF4 = CREB-2, CREM...) et Maf pour **m**usculo**a**poneurotic **f**ibrosarcoma (MafA, MafB, Maf, MafF, MafG, MafK...) (**Figure 8**). Tous ces facteurs de transcription ont en commun un domaine bZIP impliqué dans les interactions de type « coiled-coil » entre deux domaines bZIP (basic leucine **z**ipper). Ainsi, les facteurs de la famille AP-1 sont transcriptionnellement fonctionnels sous forme d'homodimère (ex : c-Jun/c-Jun) ou d'hétérodimère (ex : c-Jun/c-Fos). Certains AP-1 ne peuvent pas former d'homodimère fonctionnel, comme la famille Fos, et nécessitent l'interaction avec un membre d'une autre famille, généralement de la famille Jun. Ces nombreuses combinaisons déterminent la spécificité et l'affinité de liaison aux sites consensus des promoteurs de leurs gènes cibles car chaque dimère reconnaît une séquence consensus spécifique (*Eferl and Wagner, 2003; Eychene et al., 2008; Shaulian and Karin, 2002*).

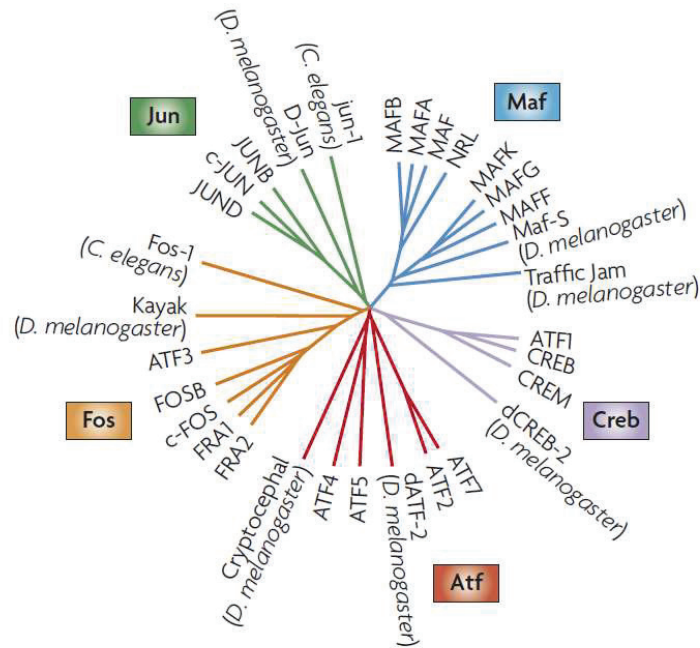


Figure 8 : Membres de la famille AP-1

Les membres AP-1 sont organisés en familles Jun, Fos, CREB/ATF et Maf (*Eychene et al., 2008*).

Les facteurs AP-1 jouent un rôle central dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T, de l'apoptose et de la production de cytokines (*Shaulian and Karin, 2002*). Le niveau d'expression basal des facteurs AP-1 est faible dans les cellules T au repos. Des stimuli comme le TNF- α ou le sérum, contenant des facteurs de croissance, activent les facteurs SRF (**serum responsive factor**) responsables de l'induction rapide des membres AP-1 (*Hall and Fujii, 2005*). Ces stimuli activent des voies de signalisation en amont de la voie AP-1, comme les voies NF- κ B, PI3K/Akt (*Peloponese and Jeang, 2006*) et les MAPK (**mitogen-activated protein kinases**) des voies ERK (**extracellular-signal-regulated kinase**), JNK (**JUN amino-terminal kinase**) et p38 (*Eferl and Wagner, 2003*) (Figure 9). En particulier, la voie NF- κ B active la voie AP-1 à deux niveaux. Les facteurs NF- κ B activent des protéines (Elk-1) en amont des membres AP-1 ou augmentent l'expression et la stabilité des membres de la famille Jun ou Fos (*Fujioka et al., 2004; Yang et al., 2005*) (Figure 9). En effet, la doxycycline, un antibiotique connu pour activer les voies NF- κ B et AP-1, ou la présence de sérum inhibent l'expression des membres AP-1 dans des MEF IKK $\alpha^{-/-}$ ou IKK $\beta^{-/-}$ par rapport aux MEF sauvages. De plus, l'interaction entre RelA et c-Fos ou c-Jun augmente leur affinité à l'ADN et leur activité à la fois sur les sites NF- κ B et AP-1 (*Stein et al., 1993*).

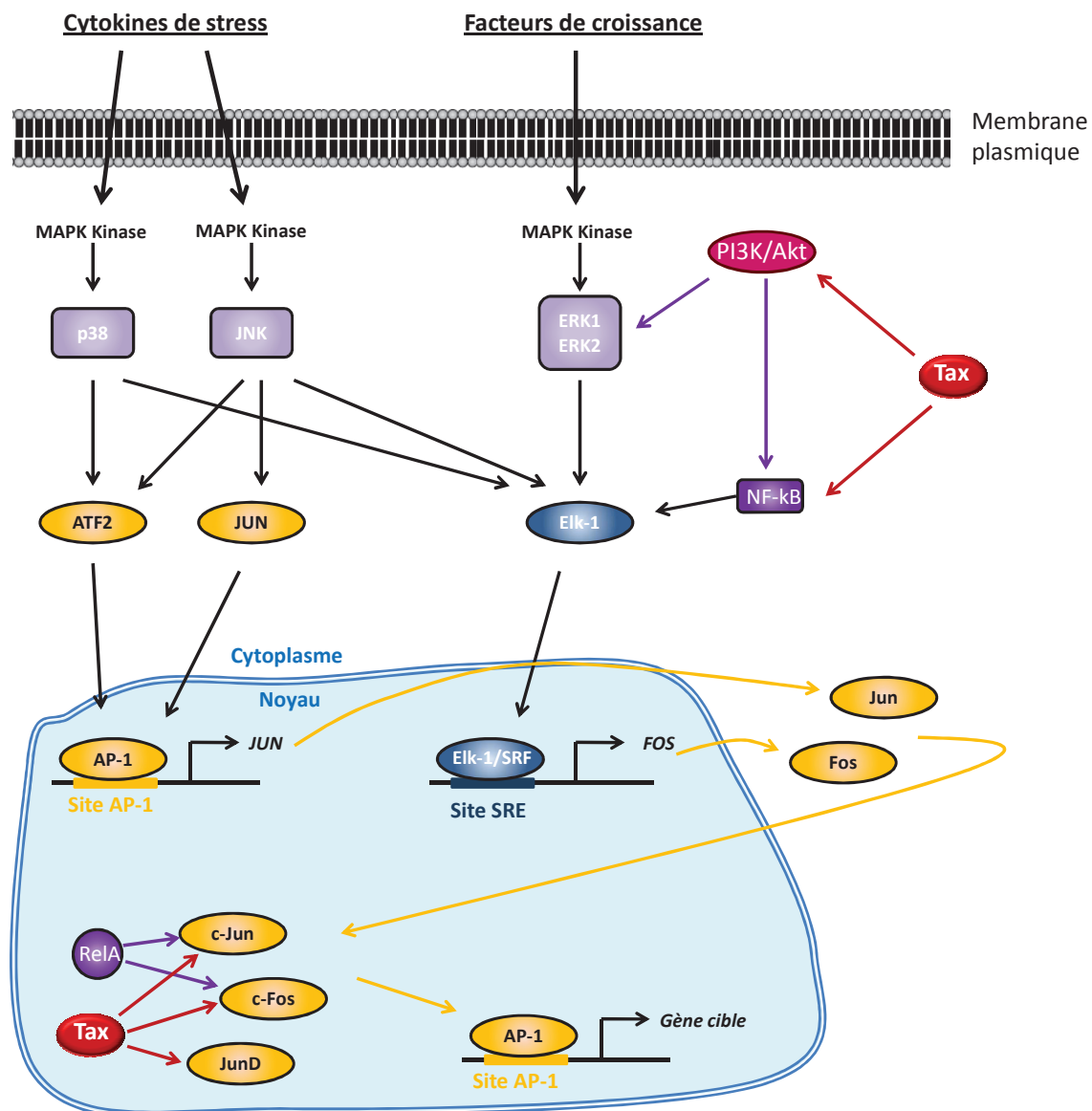


Figure 9 : Activation de la voie AP-1

Flèches noires : Des stimuli comme les facteurs de croissance activent les cascades des MAP kinases (p38, JNK, ERK1/ERK2), permettant l'activation de facteurs SRF, Elk-1 (bleu) et AP-1 (ATF2, JUN) (jaune) et la transcription des facteurs AP-1 (jaune). Les facteurs de la voie NF-κB (violet) peuvent induire l'expression de facteurs SRF comme Elk-1 ou activer l'activité transcriptionnelle de c-Jun et c-Fos. Flèches jaunes : L'expression et l'activation des membres de la famille AP-1 (c-Fos, c-Jun, JunD...) conduit à l'induction de l'expression de gènes cibles de la voie AP-1. Flèches rouges : Tax active des voies de signalisation en amont de la voie AP-1 (PI3K/Akt, NF-κB) et induit l'expression et l'activité des membres de la voie AP-1 (d'après (Eferl and Wagner, 2003; Fujioka et al., 2004; Mori et al., 2000; Peloponese and Jeang, 2006; Stein et al., 1993; Yang et al., 2005)).

Les membres AP-1 sont fortement exprimés dans des cellules cancéreuses humaines. Toutefois, leur rôle dans la tumorigenèse n'est pas clairement démontré. En fonction des combinaisons des protéines AP-1 et du contexte cellulaire, les membres de la famille AP-1

présentent une activité d'oncogène ou de suppresseur de tumeur (*Eferl and Wagner, 2003; Shaulian, 2010*). Dans le cas de l'ATLL, la voie AP-1 est constitutivement activée dans les cellules issues de patients et ces cellules expriment certains membres des familles Jun et Fos (*Mori et al., 2000; Nakayama et al., 2008*). Dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, les membres de la famille AP-1, c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB et JunD sont surexprimées (*Nakayama et al., 2008*). D'ailleurs, Tax est capable d'activer l'expression et aussi l'activité des facteurs de la voie AP-1, comme cela a été démontré dans la lignée cellulaire T murine CTLL-2 exprimant Tax (*Iwai et al., 2001*). De plus, il a été démontré que Tax active en particulier l'expression de c-Fos, Fra-1, c-Jun et JunD (*Fujii et al., 1991*) (Figure 9) et que Tax coopère avec JunD pour augmenter la transcription d'un gène rapporteur contrôlé par des sites AP-1 (*Mori et al., 2000*).

Par ailleurs, Tax active les voies PI3K/Akt et NF- κ B en amont des facteurs AP-1 (*Peloponese and Jeang, 2006; Peloponese et al., 2006*). Dans des fibroblastes d'embryon de souris, Tax induit la phosphorylation de Akt sur la sérine 473 et par conséquent son activation. De plus, l'expression de Tax et de Akt dans des fibroblastes primaires humains active l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle de sites consensus AP-1.

En conclusion, Tax induit *in vitro* l'expression et l'activité des membres de la famille AP-1, de manière directe ou en activant des voies de signalisation en amont de cette voie. Cette activité de Tax pourrait expliquer l'activation constitutive des membres AP-1 dans les lignées cellulaires T.

1-2-4/ Tax : une protéine oncogénique

Des études utilisant des puces à ADN ont permis de révéler plus de 700 gènes dérégulés dans des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 par comparaison à des lymphocytes du sang périphérique (PBL pour **p**eripheral **b**lood **l**ymphocytes) non infectés (*Pise-Masison et al., 2002*). Une autre étude a révélé 57 gènes induits et 27 gènes réprimés dans des PBMC (**p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) en culture issues de patients atteints d'ATLL par rapport à des PBMC de donneurs sains (*Harhaj et al., 1999*). Ces gènes sont impliqués entre autres dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de l'intégrité chromosomique et dans la transcription cellulaire. La majorité de ces gènes est modulés par Tax, témoignant de son activité pléiotropique (*Figure 10*).

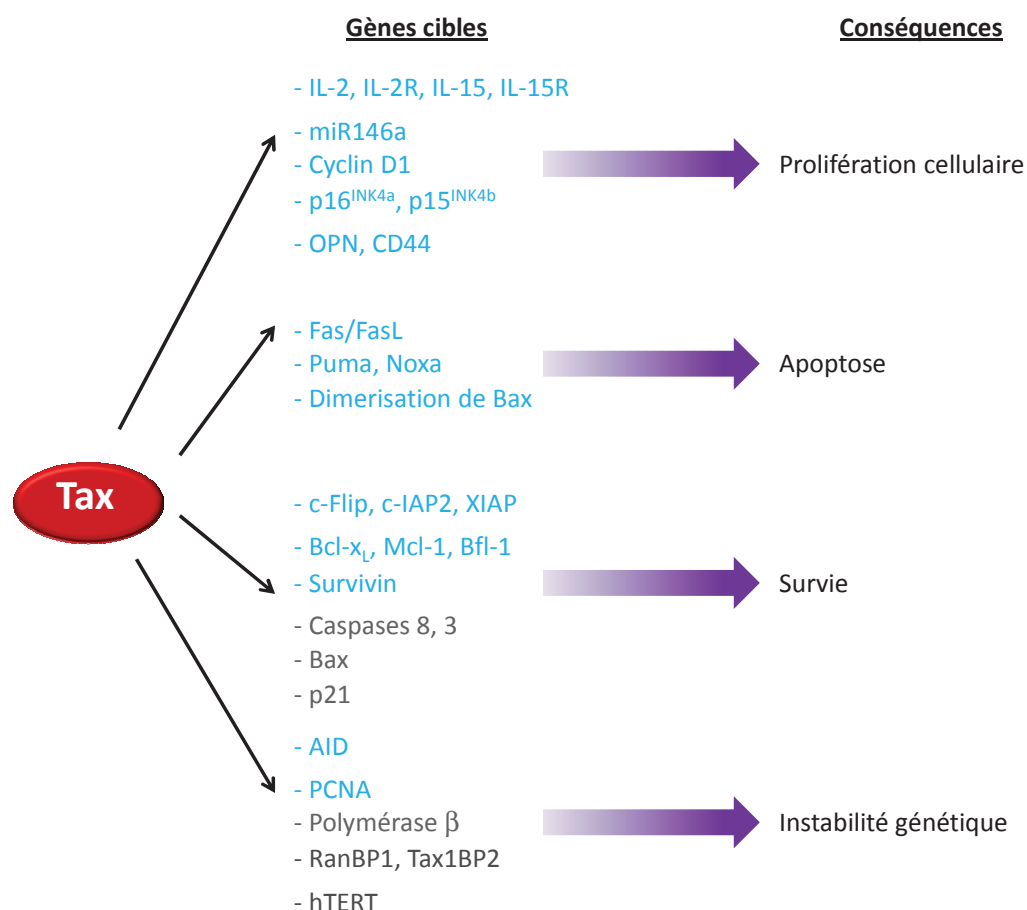


Figure 10 : Liste non exhaustive des cibles de Tax et des conséquences sur le phénotype cellulaire

Tax induit (bleu) ou réprime (gris) l'expression de gènes cellulaires de fonctions variées, conduisant à la prolifération cellulaire, à l'apoptose ou à la survie selon le contexte, à la propagation et à l'instabilité génétique.

1-2-4a/ Activation de la prolifération et contrôle du cycle cellulaire par Tax

Tax induit l'expression de cytokines, comme l'IL-2, l'IL-15 et l'OPN (osteo pontin), et l'expression de leurs récepteurs respectifs IL-2R, IL-15R et CD44 (*Silbermann and Grassmann, 2007; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2010*) (Figure 10). L'IL-2 et l'IL-15 sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la boucle OPN/CD44 serait impliquée dans l'invasion métastatique (*Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2010*). Ainsi, Tax active des mécanismes autocrines favorisant la prolifération et la propagation des cellules infectées par HTLV-1.

Par ailleurs, des études récentes montrent que Tax module l'expression de microARN (miARNs ou miR). Les miARNs sont des oligonucléotides d'environ 22 nucléotides en moyenne qui reconnaissent des séquences situées dans les régions non traduites (UTR pour **un**translated regions) en 3' des ARNm et répriment leur traduction en protéine. Tax induit l'expression de miR-146a favorisant la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 (*Tomita et al., 2009*). La capacité de Tax à activer la voie NF-κB est nécessaire à l'expression de miR-146a médiée par Tax (*Pichler et al., 2008; Tomita et al., 2009*).

Tax interagit aussi avec des régulateurs du cycle cellulaire. Ces derniers contrôlent l'intégrité de la cellule pour bloquer ou induire la progression du cycle cellulaire. En effet, lorsque les cellules sont endommagées, l'apoptose est favorisée au détriment de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, Tax, non seulement active l'expression de la cycline D1, mais interagit directement avec cette dernière pour réduire la phase G1 du cycle cellulaire (*Boxus et al., 2008; Kim et al., 2010*). Tax réprime l'activité de p16^{INK4a} et p15^{INK4b} conduisant à la répression de CDK4, à la phosphorylation et la dégradation de la protéine Rb (**retinoblastoma**) et à la transition G1/S.

De plus, Tax inhibe l'arrêt en phase G2 et inhibe l'apoptose induite par les points de contrôle du cycle cellulaire. L'ensemble de ces activités conduit à la prolifération anormale de cellules endommagées favorisant l'émergence de clones malins (*Kfoury et al., 2005*).

1-2-4b/ Régulation de la survie cellulaire par Tax

Comme cité précédemment, l'apoptose est un processus cellulaire essentiel impliqué entre autres dans l'élimination de cellules infectées. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au rôle de Tax dans le contrôle de la survie des cellules T infectées par HTLV-1. Le rôle de Tax dans la régulation de l'apoptose est apparemment controversé puisque des études démontrent une activité pro-apoptotique de Tax tandis que d'autres révèlent un effet protecteur de Tax (Figure 10). Cependant, il est généralement accepté que l'effet anti-apoptotique de Tax domine sur l'activité pro-apoptotique de Tax au cours du développement de l'ATLL.

En effet, dans certaines conditions expérimentales, Tax sensibilise les cellules à l'apoptose. L'expression transitoire de Tax sensibilise les cellules épithéliales 293T à l'apoptose suite à des dommages de l'ADN induits par des radiations UV ou par le traitement avec l'agent de pontage de l'ADN mitomycin C (MMC) (Mihaylova et al., 2008). Dans ces mêmes cellules, l'expression transitoire de Tax couplée au traitement chimique avec le MMC induit l'expression des protéines pro-apoptotiques Puma et Noxa de la famille Bcl-2 et la dimérisation de Bax, responsables de l'apoptose. Des résultats similaires ont été observés suite à l'induction de l'expression de Tax dans la lignée cellulaire T JPX9 dérivée de cellules Jurkat (Mihaylova et al., 2008). D'autres études suggèrent que la voie Fas/FasL est partiellement impliquée dans l'apoptose induite par Tax (Chlichlia et al., 1997).

Dans d'autres conditions expérimentales, Tax inhibe l'apoptose induite par des agents naturels, chimiothérapeutiques ou physiques. Les cellules T sensibles aux anticorps monoclonaux anti-Fas perdent leur sensibilité à la mort cellulaire induite par Fas suite à la transfection d'un vecteur d'expression de Tax ou à l'expression inducible de Tax (Copeland et al., 1994; Nakashima et al., 2003). Tax inhibe l'apoptose induite par la privation de sérum dans la lignée de fibroblastes murins BC (Saggioro et al., 2003). De plus, l'expression inducible de Tax dans les cellules T provoque une résistance à l'apoptose induite par TRAIL (ligand du récepteur de mort DR5 de la famille TNFR), l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II), la staurosporine (inhibiteur de protéines kinases) ou le PDTC (inhibiteur de la voie NF-κB) (Nakashima et al., 2003). D'ailleurs, des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'apoptose induite par des anticorps monoclonaux anti-Fas ou par

le traitement avec la cytokine TNF- α malgré l'expression de Fas et de TNFR2, récepteur de TNF- α , par ces cellules (*Brauweiler et al., 1997; Copeland et al., 1994; Yang et al., 2002*). Les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 sont également résistantes à l'apoptose induite par les radiations UV et le traitement avec du Taxol, un agent chimiothérapeutique qui bloque la mitose en se liant aux microtubules et en les stabilisant (*Brauweiler et al., 1997*).

Des études de puce à ADN ont montré une suppression des facteurs impliqués dans la cascade apoptotique et une stimulation des inhibiteurs de l'apoptose dans les cellules infectées par HTLV-1 (*de la Fuente et al., 2003; Harhaj et al., 1999; Pise-Masison et al., 2002*). Ces facteurs peuvent être modulés par Tax qui inhibe l'apoptose d'au moins trois manières (*Silbermann and Grassmann, 2007*).

Tax active l'expression des protéines anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases c-Flip (cellular **F**lice inhibitory **p**rotein), c-IAP2 (cellular **I**nhibitor of **a**poptosis **2**), XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis) (*Kawakami et al., 1999; Zane et al., 2010b*), des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et la protéine anti-apoptotique Survivin (*Chlichlia and Khazaie, 2010; Krueger et al., 2006; Silbermann and Grassmann, 2007*) (Figure 10).

Tax réprime l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, les caspases -8 et -3 et la kinase Chk2 (checkpoint kinase) (*Brauweiler et al., 1997; Kawakami et al., 1999*) (Figure 10). Chk2 induit l'apoptose des cellules après avoir reconnu un dommage à l'ADN. Tax interagit avec Chk2 et inhibe l'apoptose induite par Chk2, favorisant la survie cellulaire (*Boxus et al., 2008; Silbermann and Grassmann, 2007*).

Enfin, Tax active des voies de survie régulant l'expression de protéines pro- ou anti-apoptotiques. Des études montrent que l'effet anti-apoptotique de Tax serait dû à l'activation de la voie NF- κ B par Tax (*Kawakami et al., 1999*). Dans des modèles *in vitro*, Tax induit la surexpression de c-Flip via la voie NF- κ B dans la lignée cellulaire T CEM (*Okamoto et al., 2006*). La surexpression de c-Flip médiée par Tax est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par Fas dans les cellules infectées par HTLV-1. Par ailleurs, Tax protège les cellules 293 de l'apoptose induite par une surexpression de Bax par un processus impliquant la phosphorylation de CREB induite par Tax et la voie de signalisation ERK, mais pas celle de

NF- κ B (Saggioro *et al.*, 2003; Trevisan *et al.*, 2006; Vajente *et al.*, 2009). De plus, Tax et Ras coopèrent pour protéger efficacement les cellules HeLa de l'apoptose induite par une surexpression de Bax.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée en particulier au rôle des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl- x_L , Bfl-1) dans la régulation de l'apoptose des cellules infectées par HTLV-1.

Tsukahara *et al.* décrivent que la *trans*-activation de *bcl-x_L* par Tax est médiée par la voie NF- κ B dans les cellules T murines CTLL-2 exprimant Tax et les cellules T humaines Jurkat (Tsukahara *et al.*, 1999). L'utilisation de mutants de Tax (M22 et M47, Figure 5) a permis de démontrer que Tax active le promoteur de *bcl-x_L* via les voies NF- κ B majoritairement et CREB (Mori *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2000; Pise-Masison *et al.*, 2002; Tsukahara *et al.*, 1999). Deux études indépendantes ont exploré l'expression de Bcl- x_L dans les cellules d'ATLL issues de patients. Nicot *et al.* montrent que la protéine Bcl- x_L est exprimée dans des échantillons de patients atteints d'ATLL, alors que Mori *et al.* n'observent aucune variation du taux de transcrits de *bcl-x_L* entre des PBMC issues de patients atteints d'ATLL et des PBMC issues de donneurs sains (Mori *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2000). Ces résultats apparemment contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que les cellules étudiées par Nicot *et al.* ont été cultivées pendant 2 semaines et activées par la PHA (phytohemagglutinin). Il est connu qu'une partie des cellules fraîches issues de patients atteints d'ATLL n'expriment pas ou faiblement Tax et que la culture de ces cellules entraîne l'expression de Tax (Jin *et al.*, 2009). Cependant, dans ces deux études, les auteurs n'ont pas déterminé le niveau d'expression de Tax dans leurs échantillons. Aussi, les cellules d'ATLL de Nicot *et al.* expriment probablement Tax après 2 semaines de culture, ce qui pourrait donc expliquer qu'une surexpression de Bcl- x_L ait été observée.

Deux études suggèrent que l'expression de Bfl-1 est également activée par Tax. En effet, Tax active le promoteur de *bfl-1* (de la Fuente *et al.*, 2003) et une étude sur puce à ADN a révélé la surexpression de Bfl-1 dans des PBMC immortalisées issues de patients infectés par HTLV-1 par comparaison à des PBMC issues de patients non infectés (Harhaj *et al.*, 1999). Cependant, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant

l'expression de la protéine Bfl-1 dans des cellules T infectées par HTLV-1 ou des cellules d'ATLL non cultivées.

Enfin, l'expression rapide et transitoire de Mcl-1 corrèle avec l'induction de l'expression de Tax dans des cellules T CD4⁺ issues de souris transgéniques exprimant Tax sous le contrôle du LTR de HTLV-1 et activée *ex vivo* par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Swaims *et al.*, 2010).

En conclusion, les activités pro- et anti-apoptotique de Tax ne sont pas exclusives ni contradictoires. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet apparemment contradictoire. Ainsi, des hypothèses seraient que la modulation de l'apoptose par Tax dépendrait entre autres du type cellulaire, du microenvironnement, de l'environnement génétique ou des stimuli apoptotiques. Une autre hypothèse intéressante serait que l'équilibre entre l'activité pro- et anti-apoptotique de Tax dépendrait de la quantité de la protéine virale. Une forte expression de Tax induirait plutôt l'apoptose tandis qu'une faible expression de Tax serait en faveur de la survie des cellules T infectées par HTLV-1. Ainsi, seules les cellules exprimant faiblement Tax pourraient devenir résistantes à l'apoptose et donc malignes. En accord avec cette hypothèse, une forte expression de Tax est néfaste pour les cellules T infectées par HTLV-1 car Tax est reconnue par les CTL de l'hôte qui éliminent les cellules infectées (Hanon *et al.*, 2000a). L'étude de Matteucci *et al.* favorise aussi cette dernière hypothèse. Dans leur étude, des PBL ont été infectés *in vitro* par HTLV-1, puis cultivés pendant plusieurs semaines en présence d'IL-2. Une forte prédisposition à l'apoptose spontanée a été observée jusqu'à quatre semaines pendant les phases initiales suivant l'infection. En revanche, le taux de croissance des cellules primaires était bien plus élevé après 12 semaines de culture et la sensibilité des cellules à l'apoptose spontanée réduite. Les cellules deviennent en fait résistantes à l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas dès 6 semaines et jusqu'à 54 semaines (Matteucci *et al.*, 2004). Cette étude montre aussi que l'infection par HTLV-1 induit puis inhibe l'apoptose des lymphocytes. Ces deux phénotypes opposés pourraient résulter de l'activité pro- et anti-apoptotique de Tax. Nous pouvons supposer que les cellules expriment fortement Tax rapidement après l'infection, et meurent par apoptose. Des cellules exprimant faiblement Tax sont alors sélectionnées et capables de résister à l'apoptose, permettant la survie des cellules T infectées par HTLV-1. L'ensemble de ces études suggère que Tax présente plutôt un rôle anti-apoptotique faisant

intervenir de multiples mécanismes et qui serait impliqué dans le développement de l'ATLL voire dans la chimiorésistance.

1-2-4c/ Instabilité génétique générée par Tax

Il est maintenant bien admis par la communauté scientifique que les mutations, générant une instabilité génétique, sont essentielles à l'initiation de la transformation et au développement de cellules cancéreuses. Tax pourrait favoriser cette instabilité génétique en intervenant au moins à 4 niveaux.

Tax favorise l'apparition de mutations clastogéniques (ou cassures chromosomiques) dans les séquences d'ADN. En particulier, Tax induit l'expression de AID (**a**ctivation-**i**nduced **c**ytidine **d**eaminase), une enzyme provoquant des lésions dans l'ADN via la voie NF- κ B. AID est normalement exprimée dans les lymphocytes B activés et est nécessaire aux phénomènes d'hypermutations somatiques et de commutation isotypique des gènes codant pour les anticorps. En induisant à la fois une expression excessive de AID dans les lymphocytes T et la survie cellulaire, Tax favoriserait la mutagénèse (*Ishikawa et al., 2011*).

Tax perturbe les mécanismes de réparation de l'ADN. Tax augmente l'expression de PCNA (**p**rolifering **c**ell **n**uclear **a**ntigen) et réprime l'expression de la polymérase β , ce qui a pour conséquence d'inhiber les processus BER (**b**ase **e**xcision **r**epair) et NER (**n**ucleotide **e**xcision **r**epair) de réparation de l'ADN suite à des modifications chimiques ou à des mutations clastogéniques (*Chlichlia and Khazaie, 2010*).

Tax interfère également avec le contrôle de la ségrégation des chromosomes. Par interaction directe, Tax réprime RanBP1 et Tax1BP2 conduisant à l'amplification de centrosomes surnuméraires. Tax perturbe également HsMad1, une protéine assurant la bonne répartition des chromosomes. Ces événements conduisent à une ségrégation anormale des chromosomes et à l'aneuploïdie, une caractéristique des cellules d'ATLL (*Afonso et al., 2007; Pumfery et al., 2006; Yasunaga and Jeang, 2009*). hTERT (**h**uman **t**elomerase **r**everse **t**ranscriptase), la sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase, est une transcriptase reverse impliquée dans le maintien de l'intégrité des télomères aux

extrémités des chromosomes. Tax réprime l'expression de hTERT conduisant à des cassures au niveau des extrémités chromosomiques (Gabet et al., 2003; Terme et al., 2009).

Enfin, Tax réprime les points de contrôle des dommages à l'ADN et de la transition G2/M.

En conclusion, Tax est impliquée dans divers processus favorisant des modifications génomiques et réprimant leur réparation. Ces altérations peuvent être à l'origine de l'émergence de cellules T infectées précancéreuses, puis cancéreuses. Par conséquent, Tax promouvoit la leucémogénèse en contribuant à la forte instabilité génétique caractéristique des cellules d'ATLL.

1-2-4d/ L'initiation de la tumorigénèse par Tax ?

In vitro, Tax seule est capable de transformer des fibroblastes de rat, de stimuler la formation de colonies de fibroblastes de rat en agar (Tanaka et al., 1990), d'immortaliser des cellules de sang de cordon humain ou des cellules T du sang périphérique (Akagi and Shimotohno, 1993; Grassmann et al., 1992; Grassmann et al., 1989). En effet, l'infection des lymphocytes T primaires CD4⁺ de sang de cordon humain par un herpesvirus *saimiri* recombinant codant pour la région pX de HTLV-1 déficiente pour *tax* et/ou *rex* démontre que Tax, mais pas Rex, est nécessaire et suffisante pour immortaliser ces cellules (Grassmann et al., 1992). De même, l'infection de cellules T primaires dérivées de lymphocytes du sang périphérique par un vecteur rétroviral exprimant Tax permet la prolifération des cellules en présence d'IL-2, alors que les cellules T contrôles ont cessé de proliférer. Ces lymphocytes sont considérés immortalisés (Akagi and Shimotohno, 1993).

L'implication de Tax dans la tumorigénèse a également été démontrée *in vivo*. Des souris transgéniques exprimant Tax sous le contrôle du LTR-5', du promoteur/enhancer CD-3ε (expression de Tax restreinte aux leucocytes) ou du promoteur granzyme β (expression de Tax restreinte aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et aux cellules NK (Grossman et al., 1995)) développent des tumeurs mésoenchymateuses ou présentent des cellules leucémiques

ressemblant à de larges lymphocytes granuleux (promoteur granzyme β) (*Grossman et al., 1995; Lairmore et al., 2005; Zimmermann et al., 2010*). Bien que les tumeurs développées par ces souris présentent des caractéristiques éloignées de celles de l'ATLL, ces études montrent que Tax agit comme une protéine oncogénique *in vivo*.

Des souris transgéniques exprimant Tax sous le contrôle du promoteur Lck (expression restreinte au thymus) (Lck-Tax) développent, après une période de latence prolongée, des lymphomes diffus à large cellules et des leucémies, dont les aspects cliniques, pathologiques et immunologiques sont caractéristiques de la forme aiguë de l'ATLL (*Hasegawa et al., 2006*). Ce modèle démontre que l'expression de Tax est suffisante pour le développement de leucémie/lymphome T. Ce modèle murin transgénique Tax, développé par Hasegawa *et al.* a ensuite été utilisé par d'autres scientifiques, confirmant le pouvoir oncogène de Tax *in vivo*. Des souris SCID (dépourvues de cellules B et T) ont été inoculées par une lignée cellulaire dérivée de la souris Lck-Tax. Cette lignée cellulaire présente une activité constitutive des voies Akt et NF- κ B et n'exprime pas la protéine Tax à des niveaux détectables. Les souris SCID inoculées avec la lignée dérivée des souris Lck-Tax présentent des symptômes proches de l'ATLL, similaires aux souris Lck-Tax. Les cellules leucémiques des souris inoculées produisent la cytokine TNF- α , le facteur de croissance PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB) et les molécules d'adhésion sICAM-1 (soluble ICAM-1) et sVCAM-1 (soluble vascular cellular adhesion molecule-1), mais pas la lignée cellulaire avant l'inoculation. Ces données suggèrent que ces facteurs contribueraient au fort niveau de cellules leucémiques infiltrées dans ce modèle murin et au développement de la pathologie (*Watters et al., 2010*). Au sein d'une autre étude, des splénocytes issus de souris Lck-Tax ont été inoculés dans des souris SCID. Ces dernières ont développé les mêmes symptômes que les souris transgéniques Lck-Tax. Ces souris SCID Lck-Tax ont été utilisées en tant que souris primaires pour la réalisation de greffes en série. Des splénocytes issus des souris primaires ont été inoculés dans des souris SCID secondaires, puis des splénocytes issus de ces souris secondaires ont été inoculés dans des souris SCID tertiaires. Comme les souris primaires, les souris secondaires et tertiaires ont développé des symptômes proches de l'ATLL. De manière intéressante, le traitement avec la combinaison de trioxide d'arsenic et d'IFN- α (interféron- α) des souris primaires préalablement à l'inoculation des splénocytes dans les souris secondaires ralentit significativement l'initiation de la leucémie chez ces souris secondaires. De manière intéressante, les souris tertiaires issues de greffes en série d'une

souris primaire traitée avec la combinaison de trioxide d'arsenic et d'IFN- α n'ont pas développé de leucémie. Par contre, le traitement des souris primaires présentant une leucémie ne permet qu'un retard dans le développement de la pathologie et non une guérison. Par ailleurs, la combinaison de trioxide d'arsenic et d'IFN- α réprime la stabilité de Tax via le protéasome. Cette étude montre aussi que l'inhibition de Tax par le traitement de trioxide d'arsenic et d'IFN- α avant l'inoculation empêche le développement de la leucémie alors que ce même traitement une fois la leucémie établie retarde la pathologie (*El Hajj et al., 2010*).

Ces résultats suggèrent que Tax joue un rôle crucial dans l'initiation de la leucémogénèse plutôt que dans le maintien de la pathologie.

En conclusion, Tax active des voies de signalisation, induit la sécrétion de cytokines et de facteurs solubles, favorise la prolifération et la survie cellulaire et inhibe les mécanismes de réparation de l'ADN. Le fait que Tax favorise la prolifération et la résistance à la mort cellulaire permet la persistance du virus dans l'organisme. En provoquant des altérations génétiques et en favorisant la prolifération, Tax pourrait privilégier la prolifération de cellules infectées endommagées à l'origine des cellules précancéreuses. Ainsi, Tax joue un rôle essentiel au cours de l'initiation et du développement du processus leucémogène (Figure 11).

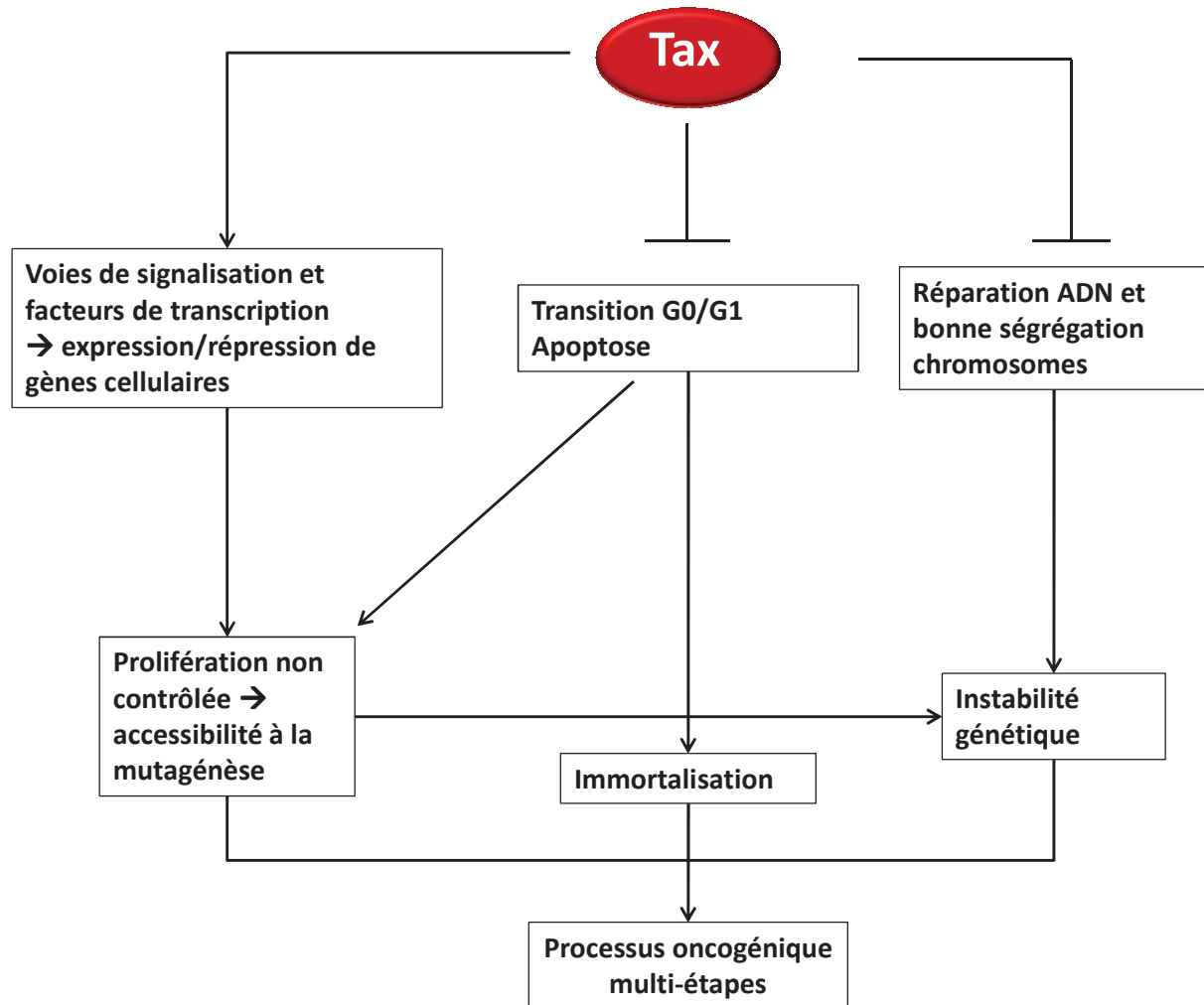


Figure 11 : Tax favorise la leucémogénèse

En modulant l'expression de protéines cellulaires de natures et de fonctions variées, Tax présente une activité pléiotropique. En induisant la prolifération, la survie cellulaire et des mutations génétiques, Tax favorise la prolifération de cellules endommagées et l'instabilité génétique. En inhibant l'apoptose, Tax favorise la survie des cellules endommagées et leur immortalisation. Les cellules T infectées par HTLV-1 peuvent alors devenir précancéreuses, puis cancéreuses. Les mutations génétiques et épigénétiques permettraient aux cellules T cancéreuses de s'affranchir de l'expression de Tax (d'après (Azran et al., 2004)).

1 – 3/ LA PROTEINE VIRALE HBZ

Les suspicions de transcription anti-sens de HTLV-1 démarrent en 1989, lors du séquençage du génome viral, par l'identification d'une ORF sur le brin moins et par la découverte d'un transcrit anti-sens de HTLV-1 par Northern Blot. C'est en 2002 seulement, qu'un crible double hybride chez la levure révélera la protéine virale HBZ de HTLV-1 comme

étant capable de se lier à CREB-2 (*Gaudray et al., 2002*). Les auteurs voulaient identifier un interacteur viral de CREB-2 autre que Tax. La protéine identifiée présente un domaine d'activation transcriptionnelle dans sa partie N-terminal et un motif bZIP dans sa partie C-terminale. En raison de ce dernier, la protéine fut nommée HBZ pour **HTLV-1 bZIP factor**. HBZ fut la première protéine virale codée par le brin anti-sens découverte.

Depuis, plusieurs équipes se sont attachées à caractériser cette protéine et à identifier ses fonctions. HBZ est une petite protéine nucléaire, dont les principales fonctions sont de moduler l'activité de facteurs de transcription, en particulier les facteurs NF- κ B et AP-1, de réprimer la transcription virale et de favoriser la prolifération des cellules infectées.

1-3-1/ Régulation de l'expression de HBZ et structure de la protéine

Le promoteur de HBZ, dépourvu de boîte TATA, est localisé dans le LTR-3' (*Figure 12*). Des séquences activatrices, dont des sites SP-1 et des éléments en aval du promoteur DPR (**d**ownstream **p**romoter **e**lement), régulent l'expression de HBZ. La mutation de 3 sites SP-1 dans le promoteur de HBZ a révélé l'importance des facteurs SP-1 dans l'activation de l'expression de HBZ. SP-1 étant un régulateur connu pour activer l'expression de gènes de ménage, ces données suggèrent que HBZ est exprimée de manière constante dans toutes les cellules infectées par HTLV-1 et explique que l'expression de HBZ soit observée dans toutes les cellules d'ATLL. Cette même étude montre que le promoteur de HBZ comporte des séquences TxRE reconnues par Tax (*Yoshida et al., 2008*). Cependant, une étude a montré que l'activation de l'expression de HBZ par Tax dépendrait largement du site d'intégration du provirus, qui est aléatoire (*Landry et al., 2009*). Par ailleurs, étant donné que Tax est généralement réprimée dans les stades tardifs de l'ATLL, l'expression de HBZ serait majoritairement activée par les facteurs SP-1 au cours de ces étapes.

Le clonage de l'ADN complémentaire de *hbz* par RLM-RACE (**R**NA ligase **m**ediated **r**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds) a permis d'isoler plusieurs isoformes de HBZ : une forme non épissée (usHBZ pour unspliced HBZ) et deux formes épissées HBZ-SP1 et HBZ-SP2 (*Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006*). Le codon initiateur ATG de la forme non épissée se trouve en aval du LTR-3' tandis que celui de la forme HBZ-SP1 est dans le LTR-3'. Le codon

initiateur ATG de la forme HBZ-SP2 n'a pas encore été identifié (Figure 12). La forme HBZ-SP1 est la plus abondante.

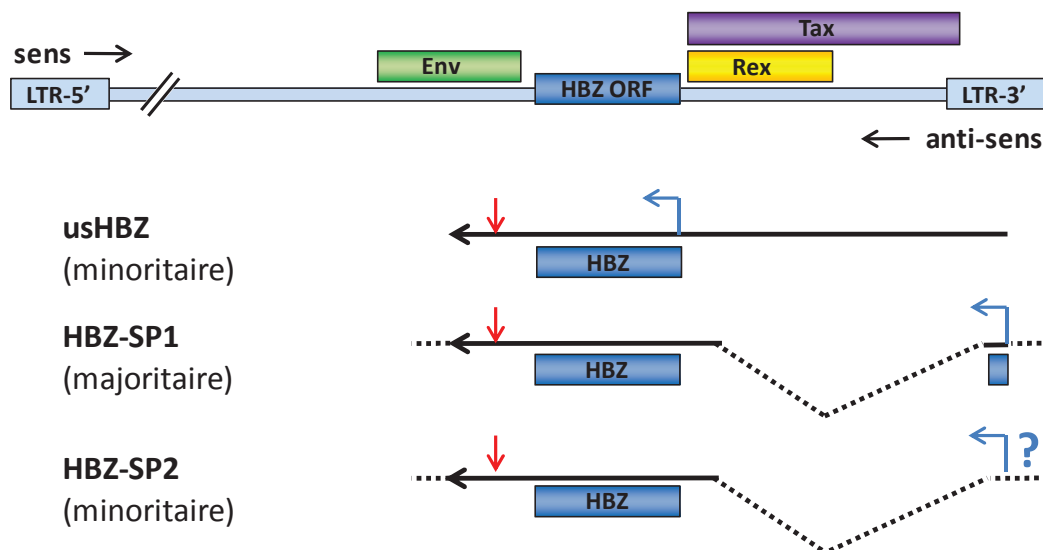


Figure 12 : Différentes isoformes de HBZ

Trois isoformes de HBZ ont été décrites : une forme non épissée (usHBZ) et deux formes épissées HBZ-SP-1 et HBZ-SP2. La forme HBZ-SP-1 est majoritaire. Le codon initiateur de la forme HBZ-SP-2 n'a pas encore été identifié. La protéine HBZ de 30 kDa est composée de 209 acides aminés dans le cas de la forme non épissée et de 206 acides aminés pour la forme HBZ-SP1. Flèche bleue : codon initiateur. Flèche rouge : codon stop, d'après (Barbeau and Mesnard, 2007; Matsuoka and Green, 2009)).

La fonction précise de chaque isoforme n'est pas clairement définie et certaines études ne précisent pas quelle forme épissée a été utilisée. Par la suite, la forme sHBZ (spliced HBZ) sera utilisée pour désigner les formes HBZ-SP1 et HBZ-SP2 sans distinction.

La protéine HBZ est essentiellement nucléaire (Hivin et al., 2007; Rende et al., 2011). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et les deux régions basiques BR1 et BR2 représentent des signaux de localisation nucléaire (NLS) (Figure 13). Des études d'immunofluorescence effectuées sur des mutants de la protéine HBZ délétés pour ces domaines révèlent qu'au moins deux de ces trois domaines sont nécessaires à la localisation nucléaire de HBZ (Hivin et al., 2007). HBZ se retrouve majoritairement dans des zones d'hétérochromatine, dans les corps nucléaires et les nucléoles. Entre les domaines BR1 et DBD se trouve un domaine modulateur (MD) contenant six acides aminés chargés impliqués dans la modulation de

l'activité transcriptionnelle des dimères formés par HBZ et ses partenaires. Le domaine bZIP et le domaine d'activation (AD) sont impliqués dans la liaison à des cofacteurs ou facteurs de transcription. Contrairement à Tax, aucune modification post-traductionnelle de HBZ n'a été décrite.

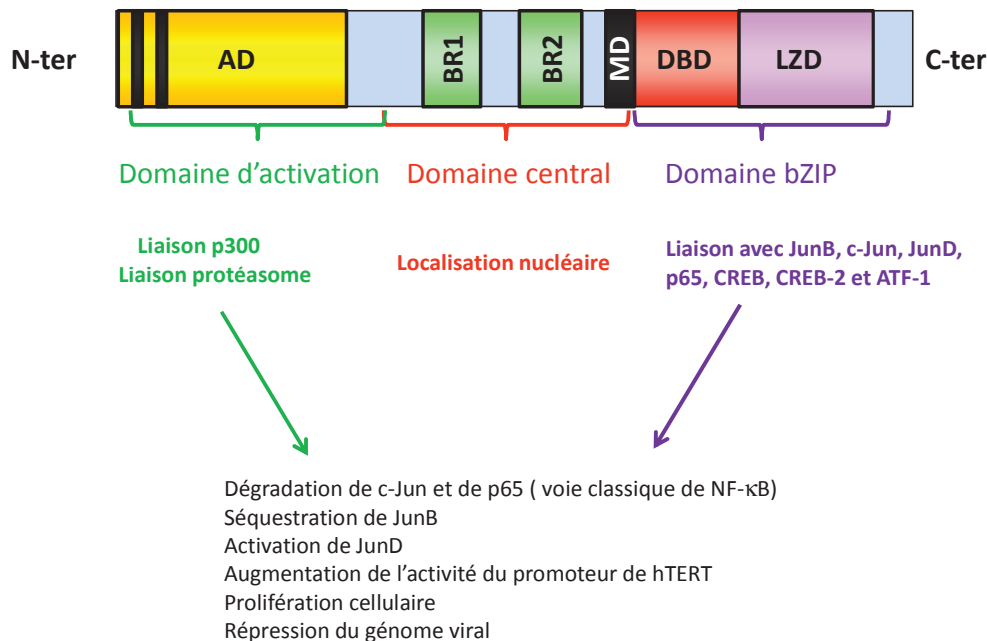


Figure 13 : Structure et fonctions de HBZ

Les domaines NLS et DBD de HBZ permettent la localisation nucléaire de la protéine virale. Les domaines AD et bZIP sont essentiels à l'interaction de HBZ avec des partenaires cellulaires. Selon ses partenaires, HBZ favorise la prolifération cellulaire (JunD) ou induit leur dégradation par le protéasome (c-Jun et p65). AD = domaine d'activation, BR = région basique, MD = domaine modulateur, DBD = domaine de liaison à l'ADN, LZD = leucine zipper (d'après (Matsuoka and Green, 2009; Satou and Matsuoka, 2010)).

Enfin, HBZ est exprimée au niveau messager dans toutes les cellules infectées par HTLV-1 (lignées cellulaires T, PBMC de patients atteints d'ATLL ou asymptomatiques) (Miyazaki et al., 2007; Satou et al., 2006; Usui et al., 2008). Les niveaux d'expression de HBZ ont été analysés *ex vivo* dans des PBMC infectées par HTLV-1 issus d'individus asymptomatiques, de patients atteints d'ATLL ou de TSP/HAM. Le messager de HBZ est fortement exprimé dans les cellules d'ATLL, plus faiblement dans les cellules TSP/HAM et très faiblement dans les cellules issues de porteurs asymptomatiques. Par conséquent, la quantité de HBZ corrèle avec la charge provirale (Li et al., 2009; Saito et al., 2009; Usui et al.,

2008). De plus, l'isoforme HBZ-SP1 est quatre fois plus abondante que usHBZ dans des cellules infectées par HTLV-1 issues d'individus asymptomatiques (26 donneurs) ou souffrant d'ATLL (28 patients) (Usui et al., 2008).

1-3-2/ Régulation de la transcription virale et cellulaire par HBZ

Comme Tax, HBZ fonctionne via des interactions protéine-protéine permettant de réguler l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs, dont majoritairement les membres AP-1, et de cofacteurs comme CPB/p300. Nous verrons que la protéine HBZ se comporte comme un membre AP-1, bien qu'elle n'ait pas d'homologue cellulaire proche (Reinke et al., 2010).

1-3-2a/ Répression de l'activité de Tax et répression virale

La capacité de HBZ à inhiber l'effet de CREB-2 et de Tax sur le LTR-5' a été observée dès sa découverte (Gaudray et al., 2002). Par sa capacité à lier les protéines CREB, c-Jun et CBP/p300, HBZ inhibe l'activation du LTR-5' ((Cavanagh et al., 2006; Clerc et al., 2008) et chapitre suivant). Clerc et al. proposent un mécanisme à deux niveaux. D'une part, HBZ, par compétition avec Tax, se lie à CREB et inhibe sa capacité de *trans*-activateur. D'autre part, deux motifs LXXXLL-like dans la partie N-terminale de HBZ interagissent directement avec le co-activateur CBP/p300 inhibant l'interaction entre Tax et CBP/p300 (Clerc et al., 2008). Cook et al. montrent que des domaines différents de CBP/p300 se lient à HBZ ou à CREB (Cook et al., 2011). Tax pourrait se lier à CBP/p300 sur le site de liaison à HBZ, expliquant la compétition entre Tax et HBZ pour ce cofacteur. Par ailleurs, sHBZ réprime l'activation par Tax du LTR-5' plus efficacement que usHBZ (Yoshida et al., 2008). Par conséquent, HBZ réprime la transcription de Tax.

HBZ pourrait réprimer Tax également au niveau post-traductionnel en induisant indirectement sa dégradation. HBZ induit l'expression de PDLIM2, une E3 ubiquitine ligase ayant la capacité d'ubiquitinyler ses partenaires et d'induire leur dégradation par le

protéasome (Zhao *et al.*, 2009). Il a été démontré que PDLIM2, en induisant la dégradation de Tax (Yan *et al.*, 2009), supprime sa capacité à induire la formation de tumeurs dans des modèles de xénogreffes chez la souris SCID.

Par conséquent, HBZ pourrait inhiber l'expression de Tax à la fois au niveau transcriptionnel (répression du LTR-5') et indirectement en induisant sa dégradation par le protéasome. Ces données expliquent que la majorité des cellules d'ATLL exprime faiblement Tax ou à des niveaux indétectables selon les études. Puisque Tax active l'expression de HBZ et qu'en retour HBZ réprime celle de Tax, une boucle de régulation négative de la protéine virale Tax par HBZ se met en place au cours du développement de l'ATLL. D'ailleurs, une corrélation négative est observée entre l'expression de Tax et celle de HBZ dans des cellules issues de patients atteints d'ATLL (Usui *et al.*, 2008). Tax étant la protéine virale majoritairement reconnue par les CTL de l'hôte et toxique pour les cellules infectées, une faible expression de Tax est nécessaire pour échapper à la surveillance immunitaire et permettre la persistance virale dans l'organisme infecté. Par ce biais, HBZ présente un rôle essentiel dans la persistance virale.

1-3-2b/ Modulation de la voie AP-1 par HBZ

HBZ forme des dimères avec un grand nombre de membres de la famille AP-1 : ATF1, ATF2 (Isono *et al.*, 2008; Lemasson *et al.*, 2007), ATF3 (Hagiya *et al.*, 2011), CREB-2, (Gaudray *et al.*, 2002), MafB (Ohshima *et al.*, 2010), JunB, c-Jun et JunD (Basbous *et al.*, 2003; Thebault *et al.*, 2004). Cependant, HBZ n'interagit pas avec c-Fos (Matsumoto *et al.*, 2005). L'ensemble de ces interactions a été confirmé récemment par l'étude d'une biopuce peptidique utilisant les peptides correspondant au domaine bZIP de HBZ ou aux domaines bZIP de 33 protéines humaines (Reinke *et al.*, 2010). Cette étude a révélé des partenaires de HBZ encore non décrits, dont Maf et MafG, et a montré que HBZ ne forme pas d'homodimère.

HBZ module l'activité transcriptionnelle des membres de la famille AP-1, mais n'agit pas sur leur niveau d'expression. En effet, HBZ inhibe l'activité de JunB, c-Jun et CREB. Il a notamment été montré que HBZ inhibe la capacité de liaison à l'ADN de c-Jun, JunB, ATF-4 et

CREB. La forme épissée de HBZ, retrouvée dans le nucléole, séquestre certains de ses partenaires comme JunB (*Hivin et al., 2007*) et c-Jun (*Clerc et al., 2009*) expliquant ainsi l'inhibition de leur activité. HBZ inhibe l'activité de c-Jun non seulement en inhibant sa capacité de liaison à l'ADN par son domaine LZD, mais aussi en induisant sa dégradation par le protéasome via sa partie N-terminale (Figure 13) (*Matsumoto et al., 2005*). En effet, le domaine N-terminal de HBZ reconnaît la sous-unité Rnp5 du protéasome et adresse directement ses ligands, liés à la partie C-terminale de HBZ, au protéasome. De cette façon, HBZ court-circuite les fonctions de l'ubiquitine conduisant à la dégradation de ses ligands (*Isono et al., 2008*).

HBZ peut également augmenter l'activité transcriptionnelle de ses partenaires. C'est surtout le cas de JunD. En interagissant avec JunD, HBZ empêche la liaison de JunD à des corépresseurs comme le répresseur menin, permettant d'accroître son activité transcriptionnelle (*Thebault et al., 2004*). Par ailleurs, HBZ coopère avec JunD pour activer l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de hTERT (*Kuhlmann et al., 2007*). En revanche, HBZ inhibe l'activation du promoteur de hTERT induite par c-Jun. Cette étude montre que Tax et HBZ présentent des activités antagonistes, puisque Tax réprime l'expression de hTERT. hTERT étant impliquée dans la prolifération cellulaire, HBZ pourrait ainsi favoriser la prolifération des cellules T infectées par HTLV-1 en activant l'expression de hTERT par JunD.

Dans les cellules d'ATLL, un nombre limité de facteurs AP-1 est exprimé. Deux techniques différentes montrent l'activité de JunD, Fra-2 et JunB par immuno-précipitation de la chromatine ou seulement celle de JunD par gel retard dans des cellules non cultivées de patients atteints d'ATLL (*Mori et al., 2000; Nakayama et al., 2008*). Ces cellules n'expriment pas c-Fos, Fra-1 ni c-Jun, dont l'expression est, comme nous l'avons vu, également activée par Tax. Ces études suggèrent que ces facteurs AP-1 activés par Tax sont réprimés dans les étapes tardives de l'ATLL *in vivo*. L'activité des membres AP-1 retrouvée *in vivo* dans les cellules issues de patients atteints d'ATLL serait donc indépendante de Tax, mais régulée par HBZ (*Fujii et al., 2000; Mori et al., 2000*). En effet, la répression de c-Jun et le maintien de l'expression de JunD pourrait être médiée par HBZ. Par conséquent, l'activation constitutive des facteurs AP-1 par Tax pourrait contribuer aux étapes précoces

du développement de l'ATLL, tandis que HBZ favoriserait l'activation de JunD et la prolifération des cellules malignes infectées par HTLV-1 dans les étapes tardives.

1-3-2c/ Répression de la voie NF- κ B par HBZ

Nous avons vu que Tax active les voies NF- κ B classique et alterne. Une étude récente montre que HBZ supprime spécifiquement la voie classique NF- κ B en diminuant la capacité de liaison à l'ADN du facteur NF- κ B p65 et en induisant sa dégradation via PDLIM2 (*Zhao et al., 2009*). En revanche, HBZ n'est pas capable de moduler la surexpression et le clivage de p100 en p52 médiés par Tax, démontrant que HBZ ne module pas la voie NF- κ B alterne dans leurs conditions (*Zhao et al., 2009*). De plus, HBZ réprime l'activation par Tax d'un promoteur NF- κ B lorsque Tax et HBZ sont co-transfectées en quantités équivalentes dans des cellules T Jurkat. En revanche, ce n'est pas le cas si Tax est cinq fois plus exprimée. Les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 expriment en général 40 fois plus Tax que HBZ (*Usui et al., 2008*). L'ensemble de ces données explique donc que l'effet de Tax soit prépondérant et que la voie NF- κ B classique soit constitutivement activée dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 malgré l'expression de HBZ.

Par ailleurs, une activation excessive de la voie NF- κ B favorise la sénescence des cellules. Ainsi, HBZ prévient la sénescence des cellules infectées par HTLV-1 en réprimant la forte activation de la voie NF- κ B par Tax (*Zhi et al., 2011*) et en induisant la dégradation de p65 (*Zhao et al., 2009*). *Zhi et al.* proposent que le ratio HBZ/Tax contrôlerait le niveau d'activation de la voie NF- κ B au cours du développement de l'ATLL, inhibant la sénescence et favorisant la persistance des cellules infectées dans l'organisme. Par ailleurs, *Zhi et al.* observent une répression partielle de p52 et p100 suggérant que HBZ peut inhiber la voie NF- κ B alterne (*Zhi et al., 2011*). Ces résultats contredisent les observations de *Zhao et al.* Par conséquent, d'autres études sont attendues pour confirmer si HBZ inhibe à la fois les voies NF- κ B classique et alterne et pour expliquer l'activation constitutive de la voie NF- κ B dans les cellules issues de patients atteints d'ATLL, lorsque HBZ est la seule protéine virale constitutivement exprimée (*Mori et al., 1999*).

1-3-3/ Contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire par HBZ

L'inoculation de lapins avec des cellules irradiées infectées par HTLV-1 muté ou non sur le gène codant pour HBZ révèle que HBZ n'est pas indispensable à la réplication virale, ni à l'immortalisation cellulaire *in vivo*. Dans le cas où le domaine bZIP de HBZ est délété, la charge provirale et les anticorps dirigés contre des protéines virales sont moindres par rapport aux lapins infectés avec le virus sauvage. Ces données suggèrent que HBZ n'est pas nécessaire à l'immortalisation *in vivo* mais augmente le pouvoir infectieux de HTLV-1 et la persistance virale (Arnold *et al.*, 2006). En effet, la forme ARNm de HBZ serait plutôt impliquée dans la prolifération cellulaire (Satou *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008). Les cellules Kit225 sont des lignées humaines T dérivées de cellules LLC-T (leucémie lymphoïde chronique de cellules T) dépendante de l'IL-2. Lorsque ces cellules sont transformées stablement avec HBZ, elles présentent une augmentation du nombre de cellules en phase S en absence d'IL-2. HBZ permet aussi d'augmenter la quantité de cellules CD4⁺ *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques où seuls les lymphocytes T CD4⁺ expriment HBZ. L'utilisation d'une construction de HBZ pour laquelle le codon d'initiation de la traduction ATG est muté en TTG, permettant l'expression de l'ARNm mais pas de la protéine, montre que la forme ARNm est responsable de l'activité proliférative de HBZ. De même, l'utilisation de différentes constructions de HBZ a montré que la structure secondaire de l'ARNm de HBZ jouerait un rôle critique dans sa capacité à induire la prolifération cellulaire (Satou *et al.*, 2006).

L'effet de HBZ sur la prolifération cellulaire pourrait être médié par sa capacité à activer des cofacteurs et des facteurs de transcription. Ainsi, la forme ARN de HBZ augmente la transcription du facteur de transcription E2F1 et de ses gènes cibles impliqués dans la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire (Satou *et al.*, 2006). De plus, en interagissant avec ATF3, HBZ favorise la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 (Hagiya *et al.*, 2011). Contrairement à la forme sHBZ, la forme usHBZ ne semble pas être impliquée dans la croissance de la lignée cellulaire T Kit225 (Yoshida *et al.*, 2008).

En 2008, Arnold *et al.* ont réalisé des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 exprimant stablement un shARN dirigé contre *hbz* (Arnold *et al.*, 2008). Dans ces conditions, la répression de HBZ supprime significativement la prolifération des lignées cellulaires. Ces observations ont ensuite été confirmées *in vivo*, où les lignées cellulaires parentales infectées par HTLV-1 (SLB-1) ou exprimant stablement le shARN dirigé contre *hbz* (SLB-1/shARN-*hbz*) ont été inoculées dans des souris NOG (NOD/SCID^{γC-/-}) immunodéficientes. *In vivo*, ces souris inoculées avec les cellules SLB-1 développent des tumeurs. Les souris inoculées avec les cellules SLB-1/shARN-*hbz* développent des tumeurs plus petites et présentent un infiltrat tumoral moins important que les souris inoculées avec les cellules SLB-1 parentales (Arnold *et al.*, 2008). Une autre étude (Satou *et al.*, 2011) présente des résultats similaires puisque des souris transgéniques exprimant HBZ sous le contrôle du promoteur spécifique des cellules CD4⁺ présentent des symptômes proches des pathologies humaines : lymphomes T et inflammation systémique de la peau et des poumons. Ces auteurs précisent également que HBZ induit directement la transcription de Foxp3 par les lymphocytes T et favorise leur prolifération cellulaire. L'activation de l'expression de Foxp3 serait due à l'activation de la voie TGF-β par HBZ (Zhao *et al.*, 2011). Un essai d'immunoprécipitation en série a montré que HBZ forme un complexe avec p300 et Smad3, des facteurs impliqués dans la voie du TGF-β, et active l'expression de gènes en aval de la voie de signalisation TGF-β, dont Foxp3. Cette étude illustre une nouvelle fois la capacité de HBZ à réprimer l'effet de Tax puisque Tax réprime la voie du TGF-β et qu'une combinaison de Tax et d'HBZ conduit à l'activation de la voie TGF-β.

En conclusion, en dérégulant des voies de signalisation ou des facteurs de transcription (E2F1, TGF-β, AP-1, NF-κB...), HBZ favoriserait la répression virale et la prolifération des cellules infectées par HTLV-1. De ce fait, HBZ joue un rôle essentiel dans la persistance virale en inhibant l'expression et l'activité de Tax qui semble être toxique à de fortes concentrations et qui est reconnue par les CTL de l'hôte.

1 – 4/ L'ATLL : UN PROCESSUS MULTI-ETAPES

L'établissement de cancers est un long processus nécessitant plusieurs étapes au cours desquelles les cellules acquièrent des mutations favorisant l'émergence de cellules précancéreuses, puis cancéreuses. Dans le cas de l'ATLL, l'infection par HTLV-1 représente la première étape du processus leucémogène. Le développement de l'ATLL est relativement rare puisque 95% des individus restent asymptomatiques. La mise en place de l'ATLL nécessite de nombreux événements séquentiels expliquant que cette pathologie ne se manifeste presque exclusivement qu'à l'âge adulte.

Un modèle de développement de l'ATLL est présenté dans [la figure 14](#). Les premiers stades suivant l'infection de l'individu par HTLV-1 sont caractérisés par une forte production de particules virales qui infectent de nouvelles cellules par contacts cellulaires. La propagation virale se ferait dans un premier temps par la production de particules virales et l'infection de nouvelles cellules, dans lesquelles le virus est intégré de manière poly-clonale ([Figure 14, étapes 1 et 2](#)).

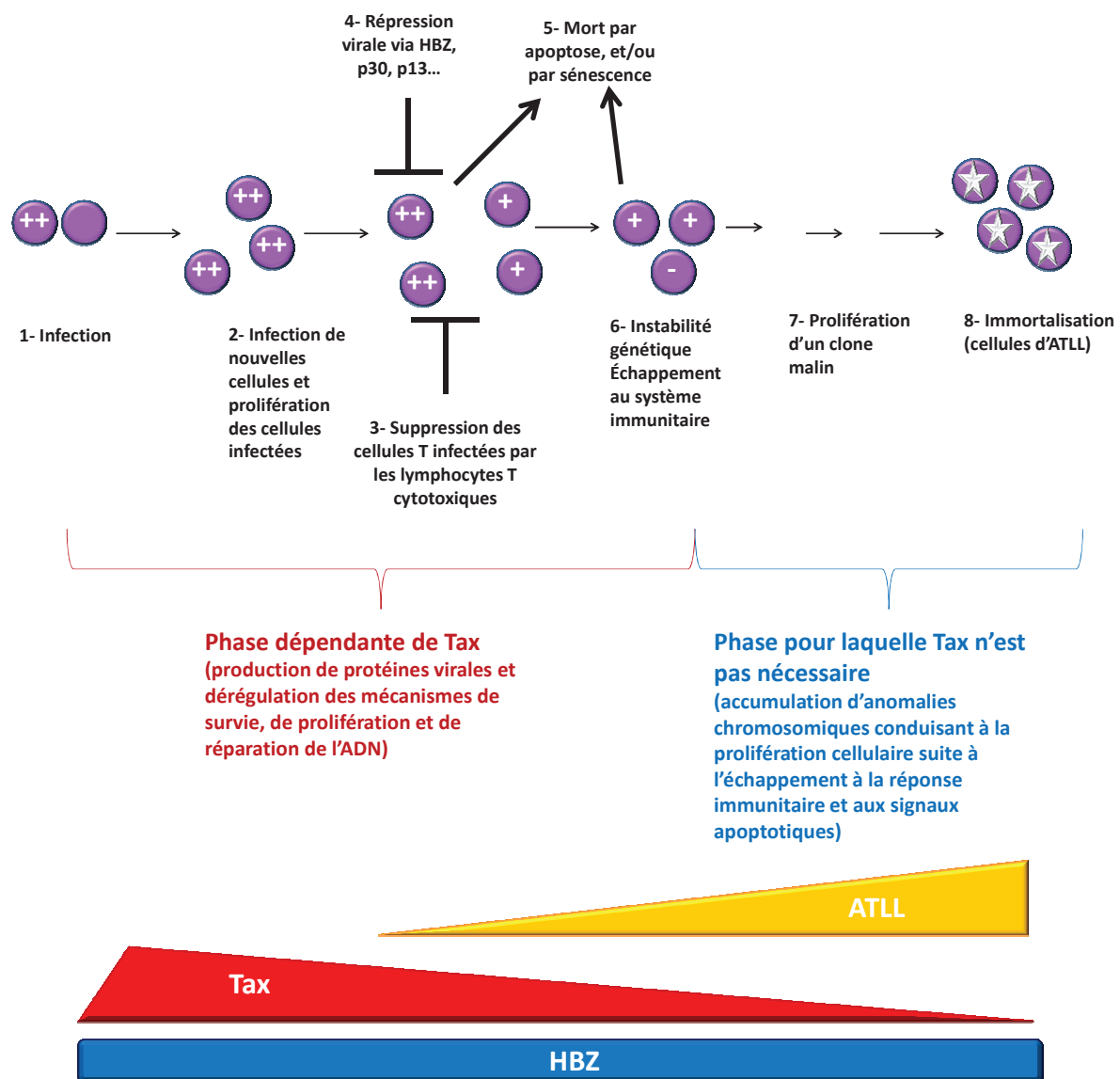


Figure 14 : Modèle de développement de l'ATLL

(1) Les cellules sont infectées par contacts cellulaires avec des cellules porteuses ou productrices de virions de HTLV-1. (2) Les cellules infectées par HTLV-1 expriment le virus, prolifèrent de manière poly-clonale et synthétisent de nouvelles particules virales. Tax est fortement exprimée et dérégule de nombreux mécanismes de contrôle cellulaire. (3, 4) La répression du génome viral et la pression du système immunitaire sélectionnent des cellules exprimant faiblement les protéines virales régulées par le LTR-5'. La charge provirale est faible et les cellules n'expriment plus ou à de faibles niveaux Tax. (5) Un niveau d'expression élevé de la protéine virale accessoire p30 conduit à l'apoptose. Les dommages à l'ADN conduisent à l'élimination cellulaire. (6, 7, 8) Des événements secondaires (accumulations d'anomalies génétiques, aneuploïdie) favorisent ensuite l'émergence d'un clone malin qui prolifère de manière mono-clonale et devient immortel. HBZ est exprimée de manière constante au cours du développement de l'ATLL et favorise la prolifération des cellules cancéreuses conduisant à une charge provirale élevée. L'ATLL se déclare 20 à 70 ans après l'infection. (++) : cellules exprimant fortement Tax ; (+) : cellules exprimant très faiblement Tax ; (-) : cellules n'exprimant plus Tax ; (étoile) : cellule typique d'ATLL.

L'expression des protéines virales serait maximale au cours des stades suivant l'infection par HTLV-1. Les protéines Gag, Env, HBZ et plus particulièrement Tax sont immunogènes (*Bangham, 2003; Suemori et al., 2009*). La majorité des cellules de l'organisme exprime à leur surface des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I couplées à des peptides antigéniques. Les CTL spécifiques de Tax, par exemple, reconnaissent le complexe CMH de classe I couplé à un peptide de Tax à la surface des cellules infectées par HTLV-1 et éliminent ces cellules. De cette façon, le nombre de cellules exprimant fortement Tax est contrôlé par la réponse CTL de l'hôte (*Hanon et al., 2000a*) (Figure 14, étape 3). Afin d'éviter l'élimination de toutes les cellules infectées par HTLV-1 par la réponse CTL, des protéines virales répriment l'expression du LTR-5' et donc des protéines immunogènes comme Tax. C'est le cas de p30, une protéine accessoire uniquement nucléaire qui séquestre l'ARNm spécifique de *tax/rex* dans le noyau, conduisant à l'inhibition de l'expression du génome viral. Comme nous l'avons vu, Tax et Rex jouent un rôle essentiel dans la production de particules virales car elles permettent l'expression du provirus et l'export des ARNm codant pour les protéines de structure et enzymatiques (Figure 4, étapes 6 et 7). Ainsi, le ratio entre l'expression de p30 et celle de Rex régule l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de la production de protéines virales, et donc le taux de réplication du virus. Comme nous l'avons vu pour HBZ (chapitre 1-3-2a), p30 inhibe aussi l'expression du LTR-5' en interagissant avec CPB/p300 par compétition avec Tax. De même, p13, lorsqu'elle est nucléaire, inhibe l'expression du génome viral au niveau transcriptionnel en réprimant la capacité de Tax à interagir avec CBP/p300 (*Silic-Benussi et al., 2010*). De plus, p8, qui est retrouvée dans le golgi et au niveau de la membrane plasmique, inhibe l'activité de NFAT, et par conséquent, réprime indirectement l'activité de Tax sur la transcription virale. Par conséquent, selon les niveaux d'expression des protéines virales, l'équilibre est favorisé vers la réplication du virus ou la latence virale. L'inhibition de l'expression du génome viral par les protéines accessoires a pour conséquence la faible expression des protéines immunogènes par les cellules infectées par HTLV-1 qui sont alors peu ou pas reconnues par les CTL (Figure 14, étape 4). Ces mécanismes aboutissent à l'échappement des cellules infectées à l'élimination immunitaire et à la persistance virale dans l'organisme infecté. Les protéines accessoires favorisent aussi l'échappement à la surveillance immunitaire par d'autres mécanismes. p12 réprime l'expression des molécules de surface reconnues par les CTL et les cellules NK (natural killer), dont les molécules du CMH de classe I et les molécules

d'adhésion ICAM-1 et ICAM-2. La protéine p30 réprime la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α ou l'IL-8, et favorise celle de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 (*Bai et al., 2010*), limitant ainsi la réponse immune antivirale. Ainsi, un équilibre entre la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 et leur élimination par les cellules immunitaires s'établit pendant plusieurs décades chez les individus infectés par HTLV-1.

Au cours de ces années de latence clinique, le virus prolifère majoritairement par expansion poly-clonale des cellules infectées. Pendant cette période, Tax est faiblement exprimée et jouerait un rôle prépondérant dans l'initiation de la leucémogénèse. Ainsi, Tax dérégule l'expression et l'activité des protéines cellulaires favorisant l'apparition d'altérations génétiques. La majorité des cellules endommagées est éliminée par apoptose et/ou sénescence, deux processus favorisés par les protéines virales accessoires (*Figure 14, étape 5*). En effet, les protéines accessoires p30 et p13 semblent impliquées dans la régulation de l'apoptose, mais leurs fonctions ne sont pas clairement établies. La protéine p30 module l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la survie (*Michael et al., 2004; Taylor et al., 2009; Taylor and Nicot, 2008*), comme les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et A1 (homologue murin de Bfl-1) ou encore Bcl-2, d'après des analyses sur puce à ARN réalisées dans des cellules Jurkat ou des PBMC (*Michael et al., 2004; Taylor et al., 2009*). Si ces études montrent que p30 inhibe l'expression des protéines anti-apoptotiques, d'autres montrent que l'expression de p30 protège des cellules T de l'apoptose induite par le camptothecin, un inhibiteur de topoisomérase I, ou par des irradiations- γ (*Anupam et al., 2011; Datta et al., 2007*). Par conséquent, les mécanismes de régulation de l'apoptose par la protéine p30 ne sont pas clairement définis et d'autres études sont attendues pour déterminer le rôle plutôt pro- ou anti-apoptotique de p30. La protéine p13 semble également présenter une fonction pro- ou anti-apoptotique selon le contexte cellulaire. Lorsqu'elle est localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, p13 module les flux de calcium et de potassium à travers la membrane interne mitochondriale, favorisant la mort par apoptose (*Silic-Benussi et al., 2010*). Toutefois, p13 ne serait pas une protéine pro-apoptotique en tant que telle, mais amplifierait plutôt les stimuli pro-apoptotiques, comme la privation de glucose ou l'engagement de Fas. Par ailleurs, p13 semble diminuer la prolifération de différentes lignées cellulaires, dont les cellules T. Cependant, ces observations obtenues dans des lignées transformées par HTLV-1

ne sont pas retrouvées dans des cellules primaires non transformées, où p13 stimule la prolifération cellulaire. Le modèle alors proposé par Silic-Benussi *et al.* est que p13 faciliterait la persistance virale en favorisant la prolifération des cellules infectées non tumorales et, au contraire, en limitant la prolifération et en favorisant l'apoptose des cellules infectées ayant un phénotype (pré)-tumoral (Silic-Benussi *et al.*, 2010).

Bien que la majorité des cellules endommagées soient éliminées, certaines mutations peuvent conférer un avantage sélectif à la cellule infectée qui devient précancéreuse. Ce phénomène serait amplifié par la protéine Tax qui, même lorsqu'elle est faiblement exprimée, stimulerait la prolifération cellulaire et bloquerait l'apoptose, permettant la survie des cellules endommagées. Les cellules T CD4⁺ exprimant Tax accumulent alors des modifications génétiques, caractéristiques de l'instabilité génétique. De cette manière, Tax confère un avantage prolifératif aux cellules T CD4⁺ préleucémiques et favorise l'acquisition de nouvelles altérations génétiques et épigénétiques dans le génome de l'hôte (Figure 14, étape 6).

Comme l'ATLL résulte de l'expansion clonale des cellules T infectées par HTLV-1, l'expression de Tax, permettant la reconnaissance par des CTL dirigés contre HTLV-1, est désavantageuse. Dans les étapes tardives du développement de l'ATLL, quelques cellules n'exprimant plus Tax et ayant acquis un avantage prolifératif par des modifications secondaires sont alors sélectionnées. Ces cellules échappent donc à la surveillance immunitaire, à l'apoptose et à la sénescence et prolifèrent de manière oligo-, puis monoclonale. Ces cellules deviennent ainsi prédominantes par rapport aux autres cellules infectées. Alors que Tax est exprimée dans 29 à 75% des cas d'ATLL selon les études (Furukawa *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2011; Miyazaki *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2001; Satou *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2004; Tamiya *et al.*, 1996), HBZ est exprimée quel que soit le stade du développement de l'ATLL (Satou *et al.*, 2006; Usui *et al.*, 2008). Cette répression de Tax pourrait résulter de modifications génétiques ou épigénétiques dans le LTR-5' ou le gène de *tax* (Furukawa *et al.*, 2001; Miyazaki *et al.*, 2007; Okazaki *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2004; Tamiya *et al.*, 1996). Par conséquent, HBZ jouerait un rôle prépondérant aux cours des étapes tardives du développement de l'ATLL. HBZ permettrait le maintien du phénotype tumoral en favorisant la prolifération des cellules d'ATLL (Figure 14, étapes 7 et 8). Par conséquent, les cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1 prolifèrent de manière monoclonale (Zane *et al.*, 2010a) et sont faiblement reconnues par

les CTL dirigés contre HTLV-1, entraînant alors une forte charge provirale corrélée à une faible réponse immunitaire caractéristique de l'ATLL (*Kannagi et al., 2011*). Les principales protéines virales Tax et HBZ sont donc complémentaires, la première favorisant préférentiellement l'initiation de la leucémogénèse et la seconde favorisant plutôt le maintien du phénotype tumoral.

1 – 5/ TRAITEMENT DE L'ATLL

Contrairement aux autres formes cliniques, les formes agressives lymphomateuses et aiguës sont de très mauvais pronostic. Les patients atteints des formes agressives rechutent généralement en raison d'une forte résistance à la chimiothérapie, d'une charge tumorale élevée, d'une hypercalcémie et d'une sensibilité accrue aux infections opportunistes. Les moyennes de survie des formes aiguë, lymphomateuse, chronique et indolente varient respectivement de 4 à 6 mois, 9 à 10 mois, 17 à 24 mois et 34 mois à 5 ans (*Tsukasaki et al., 2009*). Rappelons que les formes indolente et chronique évoluent généralement vers les formes agressives.

1-5-1/ Aperçu des approches thérapeutiques actuelles

Les traitements actuels de l'ATLL varient d'une surveillance attentive des formes indolentes à des stratégies multiples pour les formes les plus graves. De nombreuses stratégies, comme la chimiothérapie conventionnelle, les greffes de cellules souches hématopoïétiques, les anticorps monoclonaux et la combinaison de plusieurs antiviraux

utilisée « en première ligne » améliorent le pronostic des patients atteints d'ATLL (Figure 15).

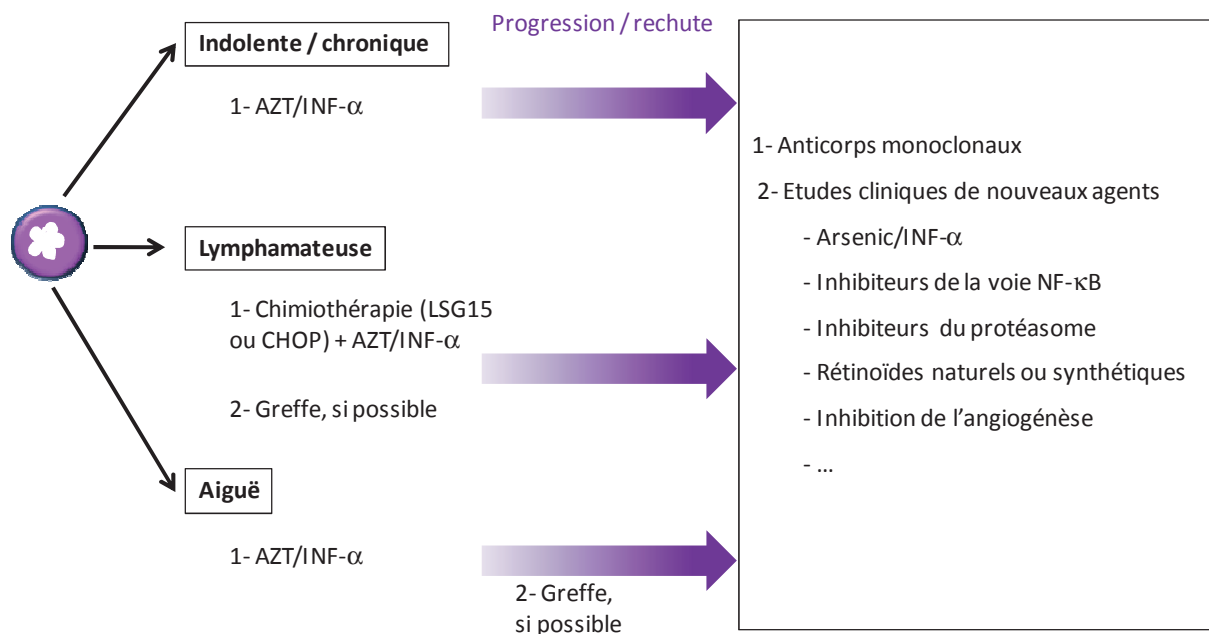


Figure 15 : Stratégies thérapeutiques actuelles contre les différentes formes de l'ATLL

Les stratégies actuelles pour traiter les formes indolente, chronique, lymphomateuse et aiguë de l'ATLL sont présentées. AZT = zidovudine ; INF- α = interféron-alpha, d'après (Bazarbachi et al., 2011; Matsuoka and Jeang, 2011).

Les traitements chimiothérapeutiques conventionnels actifs contre les lymphopathies sont largement inefficaces sur certaines formes d'ATLL (Proietti et al., 2005). Depuis 1978, plusieurs études cliniques japonaises utilisant des combinaisons d'agents chimiothérapeutiques conventionnels (type CHOP) ont été décrites sans présenter de résultats prometteurs. Récemment, le traitement nommé LSG15 utilisant 11 molécules chimiquement différentes (VCAP = vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, prednisolone + AMP = doxorubicin, ranimustine, prednisolone + VECP = vindesine, etoposide, carboplatin, prednisolone) montre des taux de rémission complète encourageants. Cependant, l'effet de LSG15 est généralement transitoire chez la majorité des patients et la moyenne de survie de 13 mois reste décevante (Bazarbachi et al., 2011; Uozumi, 2010).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la faible réponse des patients atteints d'ATLL aux traitements chimiothérapeutiques. En effet, les cellules d'ATLL expriment des protéines

impliquées dans la résistance aux drogues multiples (MDR = **m**ulti-**d**rogue **r**esistance). En particulier, la protéine LRP (**l**ung **r**esistance-related **p**rotein), un transporteur localisé dans la membrane nucléaire, est sur-exprimée dans les cellules d'ATLL et modulerait la répartition subcellulaire des agents thérapeutiques (*Yasunami et al., 2007*). Une autre explication est le fait que le traitement chimiothérapeutique pourrait aggraver l'immunodéficience déjà avérée des patients atteints des formes graves de l'ATLL, facilitant alors la contraction d'infections opportunistes. Aussi, des traitements prophylactiques complètent généralement les traitements chimiothérapeutiques.

L'utilisation d'antiviraux pour le traitement de l'ATLL semble être l'une des meilleures stratégies actuelles. Trois types d'antiviraux sont aujourd'hui utilisés en études cliniques. Leur mécanisme d'action n'est pas encore clairement défini et leur effet antiviral serait du à l'inhibition de la réplication de HTLV-1 plutôt qu'à un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses. La zidovudine (AZT) cible en particulier la reverse-transcriptase virale. L'interféron-alpha (IFN- α) induit la dégradation de Tax et l'assemblage du virus. Le trioxide d'arsenic induit la dégradation de Tax et inhibe la voie NF- κ B (*Bazarbachi et al., 2004*). Le fait que ces antiviraux représentent une stratégie thérapeutique pour le traitement de l'ATLL suggère que le virus HTLV-1 pourrait se répliquer *in vivo* à bas bruit au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL. Bien que la réplication de HTLV-1 par l'infection de nouvelles cellules représenterait une part mineure de la charge provirale par rapport à la prolifération des cellules infectées, ces traitements antiviraux utilisés en combinaisons de deux ou trois agents semblent largement efficaces.

Une méta-analyse, enquête statistique combinant les résultats d'études indépendantes réalisées depuis 1995 concernant 254 patients atteints d'ATLL, a révélé le potentiel encourageant entre autres de la combinaison de l'AZT et de l'IFN- α (*Bazarbachi et al., 2010*). En effet, le traitement antiviral AZT/IFN- α induit 100% de survie au bout de 5 ans pour les formes d'ATLL indolente et chronique. De plus, la majorité des patients atteints de la forme aiguë en rémission complète après le traitement antiviral AZT/IFN- α survit au-delà de 5 ans. Cependant, les patients atteints de la forme aiguë en rémission complète ne

représentent que 28% de l'ensemble des patients atteints de la forme aiguë traités. De plus, aucun patient atteint de la forme lymphomateuse ne répond au traitement antiviral AZT/IFN- α . Toutefois, la bonne efficacité du traitement AZT/IFN- α par rapport à la chimiothérapie et son faible coût font de ce traitement la meilleure stratégie actuelle pour traiter en première ligne les patients atteints des formes aiguë, chronique ou indolente (Figure 15).

En conclusion, l'ATLL reste une pathologie de mauvais pronostic. La faiblesse et l'état immunodéprimé des patients représentent des obstacles majeurs aux stratégies thérapeutiques actuelles de même que la forte résistance aux agents chimiothérapeutiques. Aussi, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour traiter efficacement et durablement l'ATLL.

1-5-2/ Recherche de nouveaux agents thérapeutiques

De nombreuses études visant à développer des thérapies ciblées pour traiter l'ATLL sont en cours. Ainsi, des inhibiteurs ont été développés contre la voie NF- κ B (Bay11-7082, DHMEQ, ACHP...) (Mori et al., 2002; Sanda et al., 2006; Taylor and Nicot, 2008; Watanabe et al., 2005), la voie mTOR (everolimus) (Darwiche et al., 2011), la voie Jak (AZ960) (Yang et al., 2010), la voie Akt (celecoxik) (Sinha-Datta et al., 2008), le protéasome (Bortezomib) (Ri et al., 2009; Satou et al., 2004), les facteurs de traduction (hippuristanol) (Tsumuraya et al., 2011), les histones déacétylases (LBH589, FR901228) (Hasegawa et al., 2011), l'intégrase, les déphosphorylases (anti-folate comme inhibiteur de purine phosphorylase), ou contre le suppresseur de tumeur p53 (Uozumi, 2010). De nouvelles molécules, comme les dérivés de rétinoïdes, le curcumin ou l'oridonin (Ikezoe et al., 2005), sont également étudiées. La majorité de ces inhibiteurs a montré leur potentiel à induire la mort de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et parfois de cellules d'ATLL. Toutefois, l'utilisation de ces agents

nécessite que les cellules soient capables de mourir. Par exemple, le gène p53 ne doit pas être muté.

Certains de ces inhibiteurs répriment l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bcl-2 (ACHP), Mcl-1 (Bortezomib, Oridonin, Celecoxib, AZ960) ou Bcl-x_L (Bay11-7082, ACHP, everolimus, huppuristanol, oridonin) dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et certaines fois dans des cellules d'ATLL. Sachant que l'AZ960 induit l'expression de Bcl-x_L, cette protéine anti-apoptotique pourrait donc jouer un rôle dans la résistance à l'AZ960. En effet, l'inhibition de l'expression de Bcl-x_L par ARN interférence sensibilise les cellules T MT-1 infectées par HTLV-1 à l'apoptose induite par l'AZ960 (*Yang et al., 2010*). Ces exemples suggèrent l'implication des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la survie des cellules infectées par HTLV-1. C'est une des raisons pour lesquelles nous nous sommes intéressés à comprendre les mécanismes de survie des cellules T infectées par HTLV-1 impliquant les membres de la famille Bcl-2.

2/ L' APOPTOSE REGULEE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 : IMPLICATION DES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES DANS LA LEUCEMOGENESE

2 – 1/ L' APOPTOSE : UN TYPE DE MORT CELLULAIRE

La mort cellulaire joue un rôle essentiel pour éliminer les cellules superflues, endommagées, défectueuses ou infectées. A l'inverse, la prolifération cellulaire permet de renouveler les cellules de l'organisme. L'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire détermine donc l'homéostasie cellulaire qui représente la capacité de l'organisme à maintenir un nombre constant de cellules. Différents types de mort cellulaire impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire ont été décrits, comme l'autophagie, la nécrose, l'anoïkis, la cornification, l'entosis et l'apoptose, processus auquel nous nous sommes intéressés (*Yuan and Kroemer, 2010*).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui intervient à tous les stades de la vie de l'organisme. Au cours du développement embryonnaire, l'apoptose intervient dans la morphogenèse des organes et des tissus comme lors de la séparation des doigts. Au cours de l'âge adulte, l'apoptose maintient l'homéostasie cellulaire des tissus et régule l'immunité en réduisant le nombre de lymphocytes après une infection, par exemple. La mort cellulaire par apoptose permet d'éviter une mort cellulaire non programmée et donc catastrophique pour l'organisme, et est étroitement régulée. Aussi, une dérégulation des mécanismes d'apoptose conduit à diverses pathologies. Alors qu'une mort cellulaire excessive peut conduire à une immunodépression ou à des maladies dégénératives, un défaut d'apoptose peut contribuer au développement de maladies auto-immunes et de cancers. C'est d'ailleurs en étudiant les lymphomes B folliculaires que le premier membre de la famille Bcl-2, Bcl-2 lui-même, a été découvert en 1984. Son rôle dans l'inhibition de l'apoptose sera reconnu quatre ans plus tard.

Au cours de l'apoptose, les cellules acquièrent une morphologie caractéristique : condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN et du noyau, bourgeonnement de la membrane plasmique puis formation de corps apoptotiques résultant de la fragmentation du cytoplasme de la cellule apoptotique. Au cours du processus apoptotique, l'intégrité des membranes est conservée, ce qui permet la formation de corps apoptotiques qui n'induisent pas de réaction inflammatoire. Les corps apoptotiques présentent à leur surface des phosphatidylsérines qui sont reconnues par les cellules présentatrices d'antigène comme les DC et les macrophages. Ces derniers éliminent les corps apoptotiques par phagocytose et dégradent les antigènes qui sont ensuite exposés à la surface par les molécules du CMH de classe I. Dans le cas d'une infection virale, les antigènes viraux associés aux molécules du CMH de classe I sont reconnus par les CTL. Ce processus active donc une réponse immunitaire dirigée contre le pathogène pour l'éliminer.

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'apoptose sont conservés au sein des métazoaires. Chez l'homme, deux voies majoritaires conduisant à l'apoptose ont été décrites : la voie mitochondriale ou voie intrinsèque et la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque (Figure 16). La première est déclenchée dans des conditions de stress par exemple par un défaut de signalisation par les cytokines, des dommages intracellulaires, comme des dommages à l'ADN, ou encore des oncogènes. Elle fait intervenir les membres de la famille Bcl-2 qui régulent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP pour **m**itochondrial **o**uter **m**embrane **p**ermeabilization). Dans une cellule en cours d'apoptose, le cytochrome c, retenu dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, est libéré. Il forme alors un complexe appelé apoptosome avec Apaf-1 (**a**poptotic **p**rotease-**a**ctivating **f**actor **1**) et la pro-caspase 9 dans le cytoplasme, conduisant à l'activation de la caspase 9 et aux caspases effectrices en aval. La voie extrinsèque, quant à elle, est activée par l'engagement des récepteurs de mort. L'activation des récepteurs par la liaison à leur ligand entraîne l'activation du domaine intracellulaire DD (**d**eath **d**omain). Les domaines DD peuvent interagir de manière homotypique. Ainsi, le domaine DD du récepteur de mort est reconnu par le domaine DD de FADD (**F**as-associated **d**eath **d**omain protein). FADD est une plateforme protéique qui se lie aux pro-caspases 8 et 10 par interaction homotypique des domaines DED (**d**eath **e**ffector **d**omain). Cet ensemble protéique, appelé DISC (**d**eath

inducing signaling complex), permet le clivage des pro-caspases et leur activation. La caspase 9 de la voie mitochondriale et les caspases 8 et 10 de la voie des récepteurs de mort activent des caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) qui exécutent l'apoptose. Les caspases sont des protéases cystéines qui sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (pro-caspases) et clivées sous forme active (caspases). Les caspases effectrices modulent l'activité de centaines de protéines, notamment par clivage. Ainsi, les deux voies convergent vers une même issue, l'apoptose dépendante des caspases (Figure 16).

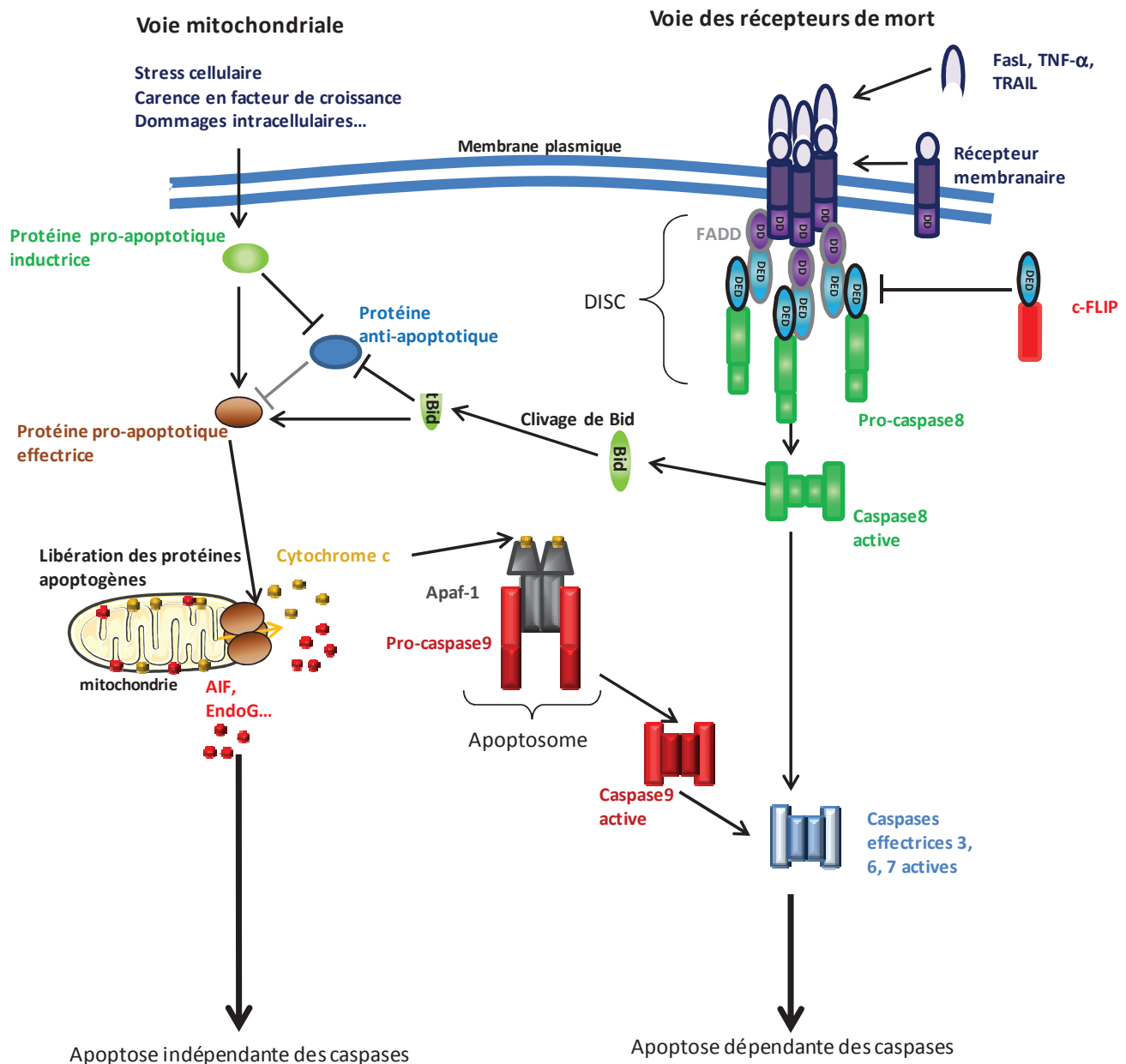


Figure 16 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose

Deux voies conduisent à l'apoptose. La voie mitochondriale est activée suite à un stress cellulaire ou des dommages intracellulaires. Cette voie fait intervenir les protéines pro-apoptotiques inductrices, effectrices et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui régulent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. La libération de cytochrome c dans le cytoplasme conduit à la formation d'un complexe apoptosome, à l'activation de la caspase 9 et des caspases effectrices. La voie des récepteurs de mort est activée par l'engagement des récepteurs de mort et conduit à la formation du complexe DISC, puis à l'activation de la caspase 8. La caspase 8 peut à son tour activer les caspases effectrices ou cliver Bid et tBid. tBid fait ainsi l'interconnexion entre les deux voies mitochondriale et des récepteurs de mort. Une voie mitochondriale indépendante des caspases a été décrite. Cette voie fait intervenir les facteurs apoptogènes comme AIF et EndoG contenue dans la mitochondrie. tBid = Bid tronqué ; DISC = death inducing signaling complex (d'après (Adams and Cory, 2007; Jourdan et al., 2009; Plati et al., 2011; Wertz and Dixit, 2010)).

Les deux voies peuvent être indépendantes puisqu'une surexpression de Bcl-2, un membre anti-apoptotique de la voie mitochondriale, ne protège pas les lymphocytes de l'apoptose induite par des ligands à leur récepteur de mort respectif (*Huang et al., 1999; Strasser et al., 1995*). Cependant, dans certains types cellulaires, les deux voies sont interconnectées puisque la caspase-8 peut cliver le membre pro-apoptotique Bid. La forme tronquée de Bid peut alors activer l'apoptose directement au niveau de la mitochondrie (Figure 16).

Il existe aussi une voie indépendante des caspases médiée par la libération dans le cytosol des molécules apoptogéniques comme AIF (apoptosis inducing factor), Smac Diablo, endoG... Comme le cytochrome c, ces facteurs apoptogéniques sont relargués de la mitochondrie. Ils amplifient l'apoptose par des mécanismes différents de ceux induits par les caspases (Figure 16).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 dans les cellules T infectées par HTLV-1. Nos résultats nous ont amenés à nous intéresser en particulier à Bfl-1, puis à Bcl-x_L. Pour cette raison, les données concernant Bfl-1 et Bcl-x_L sont particulièrement détaillées dans la suite de ce Chapitre 2.

2 – 2/ L'APOPTOSE REGULEE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2

2-2-1/ Les membres de la famille Bcl-2

Comme nous l'avons vu précédemment, Bcl-2 est le premier membre de la famille Bcl-2 identifié à l'issue d'une analyse cytogénétique de lymphomes B folliculaires. L'équipe de Croce s'était en fait intéressée à l'étude de la translocation chromosomique t(14 ; 18) suite à l'observation d'une forte corrélation entre cette translocation chromosomique et le lymphome de cellules B folliculaires humain (*Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto et al., 1984*). Cette étude montre que le réarrangement d'une région du chromosome 18 vers le chromosome 14 place le gène *bcl-2* sous le contrôle de l'enhancer E_μ qui contrôle le gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH) et induit la surexpression de Bcl-2.

Plus tard, des études effectuées chez des souris transgéniques mimant la translocation t(14 ; 18) ont montré que Bcl-2 était impliquée dans l'inhibition de l'apoptose et non dans la prolifération cellulaire (Vaux *et al.*, 1988). Par ailleurs, des souris sur-exprimant la protéine Bcl-2 humaine développent des hémopathies de type B, suggérant que l'expression de Bcl-2 et en conséquence, l'inhibition de l'apoptose, est une étape critique voire suffisante dans le processus de tumorigénèse. De plus, une surexpression de Bcl-2 dans des lignées cellulaires B murines dépendantes du facteur de croissance IL-3 protège ces dernières de l'apoptose induite par une carence en IL-3. L'ensemble de ces études a permis de définir une nouvelle classe d'oncogènes impliquée dans la survie et non dans la prolifération cellulaire. Par ailleurs, ces derniers étaient capables de coopérer avec d'autres oncogènes déjà connus comme c-myc (Vaux *et al.*, 1988).

2-2-1a/ Description de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont caractérisés par la présence de un à quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH pour **B**cl-2 **h**omology) nommés BH1, BH2, BH3 et BH4. Ces domaines, d'environ 20 acides aminés, sont très conservés entre les différents membres de la famille Bcl-2 et chez les métazoaires. Cette propriété a notamment permis l'isolation de Bfl-1 en utilisant des primers dégénérés de deux domaines conservés de la famille Bcl-2 (Karsan *et al.*, 1996b). Aujourd'hui, la famille Bcl-2 compte près de 20 membres qui sont divisés en trois groupes selon leur structure et leur fonction (Tableau – 2 et Figure 17).

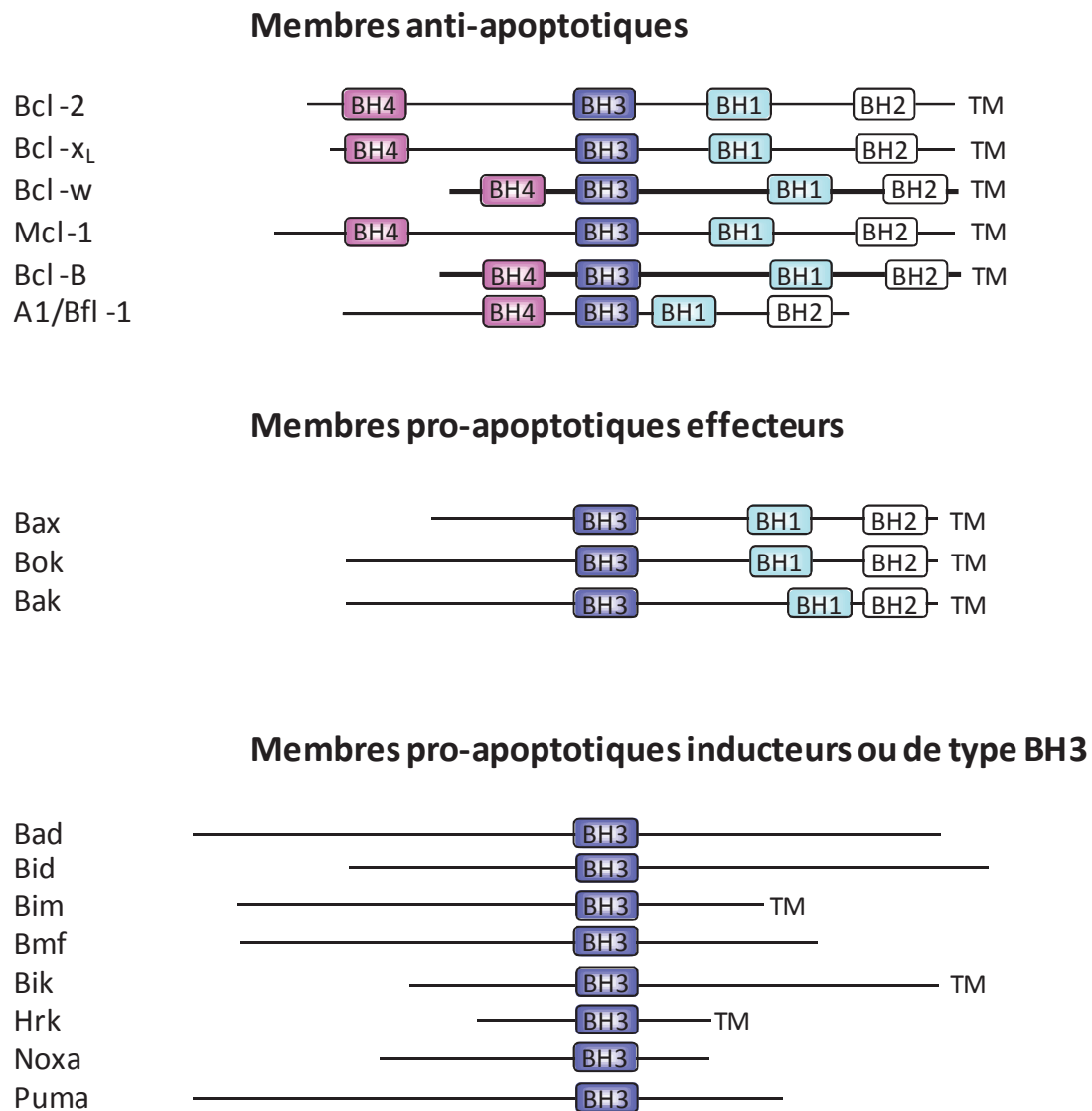


Figure 17 : Structure des membres de la famille Bcl-2

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent quatre domaines BH. Les membres pro-apoptotiques effecteurs possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3. Les membres pro-apoptotiques inducteurs possèdent uniquement le domaine BH3. BH = domaine d'homologie à Bcl-2 ; TM = domaine transmembranaire. D'après (Gross *et al.*, 1999; Strasser, 2005).

Tableau – 2 : Membres de la famille Bcl-2

Membre de la famille Bcl-2	Nom développé
Membres anti-apoptotiques	
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x _L	BCL-2-like protein
Bcl-w	BCL-2-like-2
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence-1
Bcl-B	BCL-2-like-10
Bfl-1 / Bcl2A1 / A1	Bcl-2 fetal liver/ BCL-2-related protein A1
Membres pro-apoptotiques effecteurs	
Bax	BCL-2-associated X protein
Bak	BCL-2-antagonist/killer-1
Bok	BCL-2-related ovarian killer
Membres pro-apoptotiques inducteurs	
Bad	BCL-2 antagonist of cell death
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	BCL-2-like-11
Bmf	BCL-2-modifying factor
Bik	BCL-2-interacting killer
Hrk	Harakiri (ou « death protein-5 »)
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
Puma	BCL-2-binding component-3

Les membres anti-apoptotiques (**Bcl-2**, **Bcl-x_L**, **Bcl-w**, **Bcl-B**, **Mcl-1**, **Bfl-1** et son homologue murin A1) possèdent les 4 domaines d'homologie à Bcl-2 et inhibent l'apoptose. Leur profil d'expression varie largement. Par exemple, Bcl-2 est exprimée dans les cellules B et T à différents stades du développement. Bcl-2 est retrouvée dans les cellules T des ganglions lymphatiques, de la rate et du sang périphérique (*Veis et al., 1993*).

Bcl-x_L est exprimée dans les neurones, le rein, les cellules hématopoïétiques, la moelle osseuse et fortement dans le thymus, en particulier dans les thymocytes immatures double négatifs CD4⁻CD8⁻. L'expression de Bcl-x_L diminue considérablement au cours de la sélection dans les thymocytes simple positifs et les cellules T du sang périphérique. La stimulation des thymocytes simple positifs et des cellules T du sang périphérique par le traitement PMA et ionomycine induit l'expression de *bcl-x_L* au niveau messager. Ces données suggèrent un rôle important de *bcl-x_L* non seulement dans le développement des cellules T immatures, mais aussi au cours de l'activation des cellules T matures. Il a été proposé que Bcl-x_L serait impliquée dans la survie des cellules folliculaires et germinales B subissant les hypermutations somatiques de la région variable des gènes des immunoglobulines réarrangés (Beroukhim et al., 2010; Grillot et al., 1996). Par ailleurs, *bcl-x_L* serait impliquée dans la résistance à l'apoptose des cellules neuronales adultes (Boise et al., 1993).

Mcl-1 est essentielle pour la survie des cellules souches hématopoïétiques et est impliquée dans le développement et le maintien des lymphocytes B et T. De plus, Mcl-1 joue un rôle dans la survie des fibroblastes synoviaux, des neutrophiles et dans le développement neuronal. La délétion de Mcl-1 dans des embryons de souris est létale. En plus de ses rôles dans la différenciation cellulaire et la régulation de l'apoptose, Mcl-1 retarde la progression du cycle cellulaire (Thomas et al., 2010).

L'homologue murin de Bfl-1, A1 partage 72% d'homologie avec la protéine Bfl-1. Il a d'abord été décrit comme un gène induit par le facteur de croissance GM-CSF (**granulocyte-macrophage colony-stimulating factor**) (Lin et al., 1993). A1 est particulièrement exprimée dans les cellules périphériques B immatures et matures par rapport aux autres protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. L'expression de A1 est causée par l'engagement du BCR suggérant un rôle de A1 dans la survie des cellules B activées et au cours des étapes de la sélection lors du développement du linéage B (Trescol-Biemont et al., 2004). Dans les cellules T, A1 est exprimée dans les thymocytes, les lymphocytes T naïfs et activés suite à l'engagement du pré-TCR ou du TCR et est impliquée dans la survie des cellules T activées et au cours de la sélection β et de la sélection positive lors du développement du linéage T (Mandal et al., 2005; Verschelde et al., 2006). Contrairement à Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1, l'expression de A1 n'est pas induite par l'activation des récepteurs aux cytokines dans les cellules T (Verschelde et al., 2003). Dans les cellules T matures, l'engagement du TCR induit une expression transitoire de A1 et de Bcl-x_L suivie de celle de Bcl-2 (Verschelde et al., 2003).

Par contre, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 ne sont pas exprimées suite à l'engagement du pré-TCR (*Mandal et al., 2005*). Une déficience en A1 diminue la survie des lignées leucémiques T murines malgré la présence d'un pré-TCR fonctionnel et des membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. Enfin, l'expression ectopique de A1 induit la survie et la différenciation de thymocytes dépourvus de TCR. A1 est donc spécifique et nécessaire à la survie pendant la sélection du pré-TCR (*Mandal et al., 2005*). Par conséquent, A1 joue un rôle important dans la survie de manière dépendante de l'antigène à la fois des cellules B et des cellules T.

Chez l'homme, l'expression de Bfl-1 au niveau messager est fortement détectée dans la moelle osseuse, les poumons, la rate, les lymphocytes et plus faiblement dans le thymus, les testicules et le petit intestin (*Karsan et al., 1996b*). Bfl-1 est donc préférentiellement exprimée dans les organes du système immunitaire (*Zong et al., 1999*). L'expression de Bfl-1 est induite par des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) (*Karsan et al., 1996a; Zong et al., 1999*), par des agents chimiothérapeutiques conventionnels (*Cheng et al., 2000*), par l'engagement du TCR en présence de la costimulation CD28 (*Wang et al., 2008*) et par l'engagement de CD40 dans des lignées de lymphomes de Burkitt. Par ailleurs, une étude transcriptomique montre que Bfl-1 est rapidement et constitutivement exprimée dans les cellules CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ suite à l'activation des cellules T par un anti-CD3 et un anti-CD28 (*Wang et al., 2008*). Bfl-1 jouerait donc un rôle dans la survie des cellules T activées.

Le deuxième groupe de la famille Bcl-2 inclut les membres pro-apoptotiques effecteurs ou pro-apoptotiques à multi-domaines qui possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3. Ces membres de la famille Bcl-2 (**Bax, Bak, Bok, Bak/MTD**) sont directement responsables de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. L'expression de Bax et Bak est plutôt ubiquitaire, tandis que celle de Bok semble restreinte aux tissus reproductifs. Bax et Bak possèdent des fonctions redondantes puisque des MEF déficients pour *bax* ou *bak* sont aussi sensibles à l'apoptose que les cellules non déficientes. Cependant, des MEF déficients à la fois pour *bax* et *bak* sont résistants à l'apoptose (*Wei et al., 2001*), démontrant ainsi qu'au moins une de ces deux protéines est indispensable pour induire l'apoptose.

Le troisième groupe rassemble les membres pro-apoptotiques inducteurs qui sont également appelés membres pro-apoptotiques de type BH3 ou « BH3-only » car ils possèdent uniquement le domaine BH3 (**Bad, Bid, Bim, Bmf, Bik, Hrk, Noxa, Puma**). Ils sont les premiers membres de la famille Bcl-2 induits suite aux stimuli apoptotiques.

Bim, un des membres de type BH3 les plus étudiés, est essentiel au développement hématopoïétique et à l'homéostasie des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les facteurs de croissance comme l'IL-3 et le GM-CSF répriment l'expression de Bim, favorisant ainsi la survie des progéniteurs hématopoïétiques sains. Dans des conditions pathologiques, une répression anormale de Bim conduit à l'auto-immunité ou à une réponse immunitaire excessive suite à une infection (*Kuroda and Taniwaki, 2009*). Concernant les cellules T, Bim est impliquée dans l'apoptose des thymocytes suite à la perte de CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand), une protéine du réticulum endoplasmique (*Edgar et al., 2010*).

Bad et Puma ont été définies comme des suppresseurs de tumeurs. Les souris déficientes pour Bad développent des leucémies/lymphomes, en particulier après irradiations. Une déficience pour Puma accélère la lymphomagenèse induite par l'oncogène Myc. Puma est responsable de l'apoptose médiée par p53 suite à des dommages dans l'ADN. Cependant, Puma est aussi impliquée dans l'apoptose indépendante de p53 suite à une carence en cytokines, ou à des traitements par les drogues comme des glucocorticoïdes ou la staurosporine (inhibiteur de kinase) (*Kuroda and Taniwaki, 2009*).

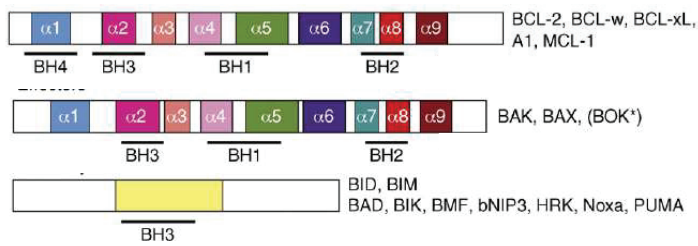
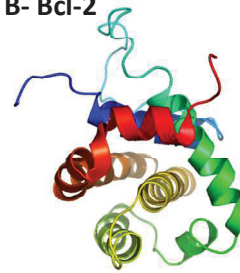
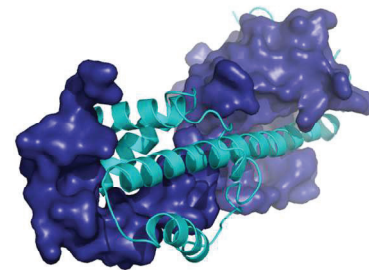
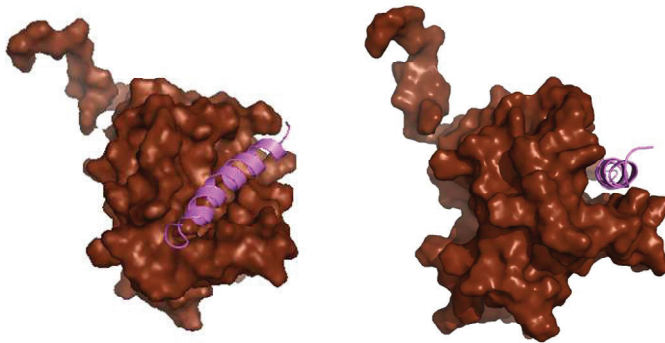
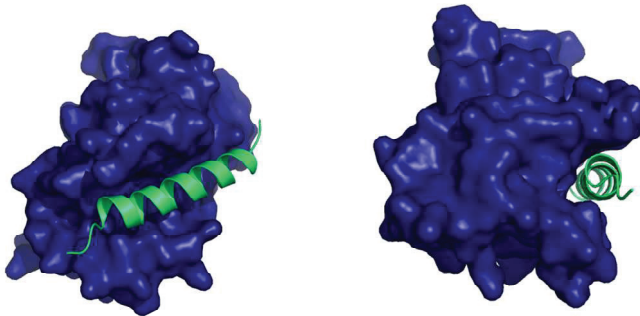
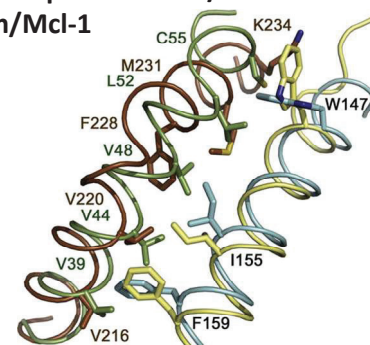
La protéine pro-apoptotique Noxa a d'abord été décrite dans des lignées d'ATLL comme une protéine induite par un ester de phorbol (*Hijikata et al., 1990*). Comme Puma, Noxa est une cible transcriptionnelle de p53 (*Kuroda and Taniwaki, 2009*).

2-2-1b/ Structure : localisation intracellulaire et profils d'interaction

Les membres de la famille Bcl-2 sont constitués de plusieurs hélices α qui définissent leur structure tridimensionnelle. Nous allons voir que ces structures sont en lien avec leur localisation cellulaire et leur fonction.

Structure et localisation intracellulaire

Bien que les membres de la famille Bcl-2 diffèrent dans leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle présente de fortes similarités. On retrouve une structure globulaire formée par sept ou huit hélices alpha amphipathiques organisées autour d'une hélice centrale encastrée $\alpha 5$ (Figure 18A et B). Les domaines BH1 (hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$) et BH2 (hélices $\alpha 7$ - $\alpha 8$) d'un côté et le domaine BH3 ($\alpha 2$) et l'hélice $\alpha 3$ de l'autre côté délimitent une poche hydrophobe. Cette structure globulaire est retrouvée chez tous les membres de la famille Bcl-2 à multidomaines (Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bax et Bak) et de manière surprenante chez le membre pro-apoptotique Bid qui ne possède que le domaine BH3 (Youle and Strasser, 2008).

A- Structure des membres de la famille Bcl-2**B- Bcl-2****D- Dimère de Bcl-x_L****C- Bax****E- Bfl-1/Bim-BH3****F- Comparaison Bim/Bfl-1 et Bim/Mcl-1****Figure 18 : Représentation des structures tridimensionnelles des membres de la famille Bcl-2**

Les membres de la famille Bcl-2 sont composés d'hélices α qui forment une structure globulaire. **(A)** Structures des membres de la famille Bcl-2 représentant les différentes hélices α (D'après (Chipuk and Green, 2008)) **(B)** Représentation « cartoon » de la structure tridimensionnelles (3D) de Bcl-2 (PDB : 1G5M). **(C)** Structure 3D de Bax (marron) et son hélice α C-terminale (violet) repliée dans la poche hydrophobe. Deux angles de vue différents sont représentés (PDB : 1F16). **(D)** Structure 3D de deux protéines Bcl-x_L formant un homodimère. La partie C-terminale de chaque dimère se trouve dans la poche hydrophobe de son partenaire (PDB : 2B48). **(E)** Structure 3D de la protéine Bfl-1 (bleu) en complexe avec l'hélice α du domaine BH3 de Bim (vert). Deux angles de vue différents sont représentés (PDB : 2VM6). **(F)** En se liant à Bfl-1 ou à Mcl-1, Bim adopte une conformation légèrement différente. Représentation en ruban des hélices $\alpha2$ et $\alpha3$ de Bfl-1 (vert) et de Mcl-1 (brun) et du peptide Bim issue du complexe Bfl-1 : Bim (vert : jaune) ou du complexe Mcl-1 (PDB : 2PQK) : Bim (brun : bleu) (Herman et al., 2008). Les représentations 3D sont issues du logiciel pyMol (DeLano et al., 2008). Les structures des membres de la famille Bcl-2 sont disponibles sur le site <http://bcl2db.ibcp.fr/site/>. PDB = protein data bank.

En plus de ce « core » globulaire, les membres de la famille Bcl-2 possèdent une séquence hydrophobe dans leur partie C-terminale. Cette partie C-terminale est incluse dans l'analyse de certaines structures, dont celle des protéines Bax, Bcl-w et Mcl-1. Ces analyses révèlent que la partie C-terminale est repliée dans la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 (Figure 18C). De plus, comme le montre la structure tridimensionnelle des dimères de Bcl-x_L, les protéines Bcl-x_L peuvent former des dimères en positionnant leur partie C-terminale dans la poche hydrophobe de leur partenaire (Figure 18D).

Par ailleurs, il a été montré que la séquence hydrophobe dans la partie C-terminale est un domaine transmembranaire (TM) impliqué dans l'insertion dans les membranes. Ainsi, des membres de la famille Bcl-2 sont localisés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et aussi au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. Bcl-2 est surtout présent au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire (2/3) et également de la membrane externe de la mitochondrie (1/3). Cependant, d'autres membres de la famille Bcl-2, comme Bcl-x_L ou Mcl-1, se trouvent à la fois au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie. La flexibilité de la partie C-terminale pourrait expliquer cette double localisation. Dans les formes cytosoliques, la partie C-terminale serait repliée dans la poche hydrophobe de la molécule dans le cas de monomère (Mcl-1) ou du partenaire dans le cas de dimère (Bcl-x_L) (Jeong *et al.*, 2004). Dans les formes membranaires, la partie C-terminale transmembranaire serait insérée dans la bicouche lipidique. En revanche, Bcl-w est uniquement cytosolique sous forme de monomère (Hinds *et al.*, 2003) (Figure 19).

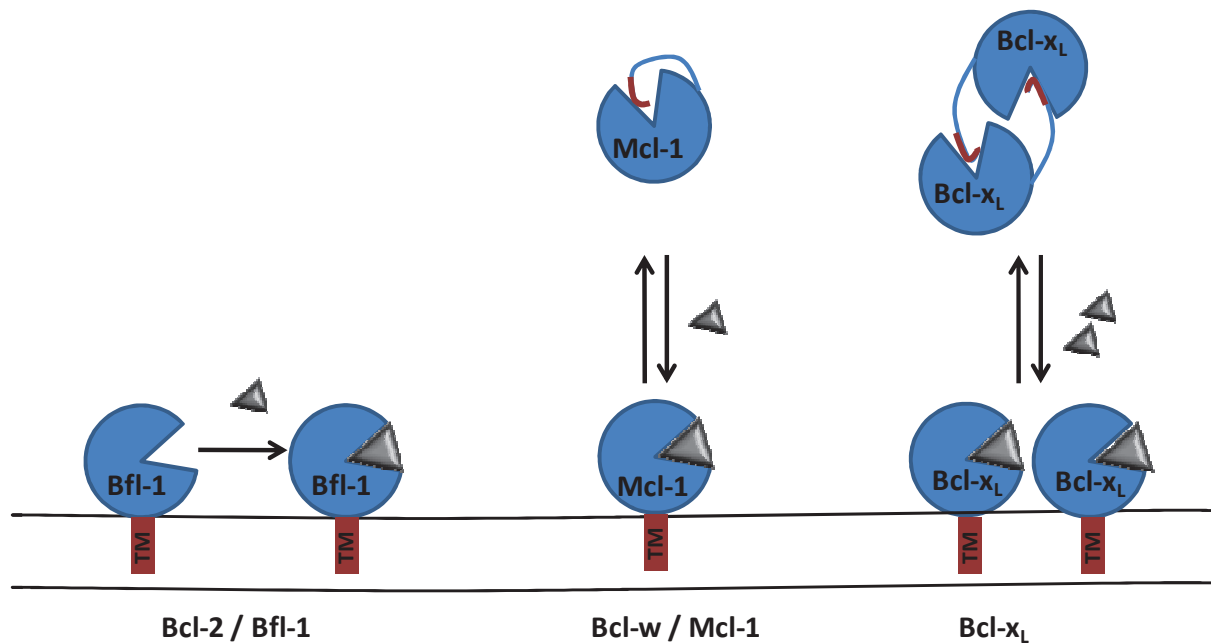


Figure 19 : Localisation des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Certains membres anti-apoptotiques sont uniquement membranaires (Bcl-2, Bfl-1). D'autres membres anti-apoptotiques sont cytoplasmiques sous forme de monomère (Mcl-1, Bcl-w) ou sous forme de dimère (Bcl-x_L) lorsque leur poche hydrophobe n'est pas occupée par un partenaire et est donc disponible pour accueillir leur partie C-terminale. L'occupation de leur poche hydrophobe par un partenaire pro-apoptotique (triangle) déplace la partie C-terminale permettant la localisation de Bcl-x_L, Mcl-1 et Bcl-w au niveau des membranes. TM : domaine transmembranaire ou de type transmembranaire.

Bfl-1, quant-à elle, est majoritairement localisée au niveau de la mitochondrie dans des cellules saines, les PBL traités avec l'étoposide et des lignées lymphoblastoïdes B (Figure 19). Bfl-1 a la particularité de ne pas posséder de domaine TM clairement défini dans son extrémité C-terminale. La présence de trois acides aminés chargés dans une région riche en acides aminés hydrophobes confère à l'hélice α une nature amphipathique. Les lysines en amont de cette région hydrophobe sont essentielles à la localisation au niveau de la mitochondrie (Ko et al., 2007). Il a été montré que le caractère amphipathique de l'hélice α est nécessaire à la localisation de Bfl-1 à la mitochondrie et à son activité anti-apoptotique. Ces données suggèrent que la localisation au niveau de la mitochondrie est nécessaire à l'activité anti-apoptotique de Bfl-1 (Brien et al., 2009).

Dans une cellule saine, il a été montré que le membre pro-apoptotique effecteur Bax est localisé majoritairement dans le cytosol et séquestre son extension C-terminale hydrophobe dans sa poche hydrophobe. Cependant, une fraction mineure est liée à la

membrane externe de la mitochondrie. De ce fait, Bax est capable d'effectuer des allers-retours du cytoplasme à la mitochondrie. Une étude récente propose que ce mouvement serait médié par Bcl-x_L qui formerait un dimère avec Bax à la mitochondrie, décrochant le dimère Bcl-x_L/Bax de la membrane. Une fois dans le cytoplasme, ce dimère se romprait et Bcl-x_L retournerait à la membrane (Figure 19). Ce phénomène jouerait un rôle important pour réguler la localisation cytosolique de Bax et éviter la perméabilisation de la mitochondrie (Edlich et al., 2011; Soriano and Scorrano, 2011). En revanche, Bak est uniquement localisé à la mitochondrie où il formerait des dimères avec les membres anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 (Willis et al., 2005). Bak rompt les dimères cytosoliques de Bcl-x_L et induit la localisation mitochondriale de ce dernier (Jeong et al., 2004). De même, Bim, en se liant à Bcl-w, permet sa translocation à la mitochondrie.

Les membres pro-apoptotiques inducteurs, à l'exception de Bid et probablement de Bik, ne sont pas structurés intrinsèquement. Ils ne possèdent pas systématiquement de domaines hydrophobes et se trouvent dans le cytoplasme sous forme inactive. Le domaine BH3 représente l'unité minimale fonctionnelle des protéines de type BH3 (Chen et al., 2005). Ces domaines peuvent être synthétisés sous forme de peptides BH3 fonctionnels (Certo et al., 2006; Walensky et al., 2004). Des études structurales des membres anti-apoptotiques en complexe avec le domaine BH3 d'un membre pro-apoptotique ont été réalisées et révèlent la localisation du peptide BH3 dans la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques. A titre d'exemple, le domaine BH3 de Bim forme une hélice α dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L ou de Bfl-1 (Herman et al., 2008; Liu et al., 2003) (Figure 18E). Une étude montre que le domaine BH3 de Bim se structure sous forme d'une hélice α au contact de Bcl-w (Hinds et al., 2007). Ainsi, la poche hydrophobe des membres de la famille Bcl-2 à multidomaines peut accueillir non seulement leur partie C-terminale hydrophobe, mais également le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques inducteurs ou effecteurs, déterminant leur localisation intracellulaire (Figure 19).

Contrairement aux régions BH très conservées, les extrémités N- et C-terminales varient. La plupart des membres anti-apoptotiques possèdent notamment une boucle N-terminale entre les domaines BH4 et BH3 dont la longueur et la séquence diffèrent. Cette

boucle non structurée est impliquée dans la régulation de leur fonction anti-apoptotique par des mécanismes de protéolyse ou de phosphorylation (chapitre 2-2-1d). Mcl-1 diffère des autres membres anti-apoptotiques par une longue extension N-terminale également impliquée dans la régulation de sa fonction et de sa dégradation.

Profils d'interaction

Par leur structure complémentaire, les membres de la famille Bcl-2 peuvent interagir entre eux. La spécificité de liaison entre les différents membres de la famille Bcl-2 a été déterminée par des analyses variées (double-hybride chez la levure, BIACORE, perméabilisation de liposomes ou mitochondries en milieu acellulaire) utilisant les protéines entières ou des peptides correspondant aux domaines BH3 (*Certo et al., 2006; Chen et al., 2005; Letai et al., 2002*). Ces études montrent que des membres pro-apoptotiques inducteurs, comme Bim et Puma, se lient à tous les membres anti-apoptotiques (Figure 20). La comparaison des structures tridimensionnelles de Bfl-1/Bim-BH3 (domaine BH3 de Bim) et de Mcl-1/Bim-BH3 explique la capacité de Bim à lier l'ensemble des membres anti-apoptotiques par sa forte labilité (*Herman et al., 2008*) (Figure 18F). Le fait que Bim se structure au contact de son partenaire anti-apoptotique lui permet d'adopter une structure légèrement différente en fonction de son partenaire. Cette caractéristique confère à Bim la capacité d'interagir avec des partenaires de structure différente. Par contre, Bad et Noxa sont spécifiques de certains membres anti-apoptotiques. Bad se lie à Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, tandis que Noxa est spécifique de Mcl-1 et de A1/Bfl-1 (Figure 20A et (*Chen et al., 2005*)). La spécificité de Noxa vis-à-vis de Mcl-1 est contrôlée par deux résidus dans le domaine BH3 de Noxa puisque des mutations de ces résidus confèrent à Noxa une forte affinité pour Bcl-x_L et Bcl-w, mais pas Bcl-2, tout en maintenant une forte spécificité pour Mcl-1 (*Chen et al., 2005*).

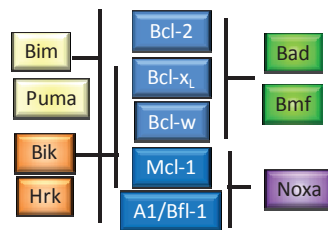
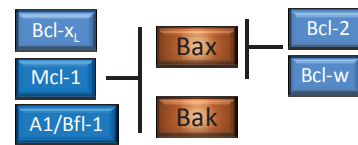
A- Interaction des membres anti-apoptotiques avec les membres pro-apoptotiques inducteurs

B- Interaction des membres anti-apoptotiques avec les membres pro-apoptotiques effecteurs


Figure 20 : Profils d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2

(A) Profil d'interaction des membres anti-apoptotiques (bleu) avec les membres pro-apoptotiques inducteurs (jaune, orange, vert et violet) obtenu par des tests de compétition mesurés en Biacore (*Chen et al., 2005*). Bim et Puma (jaune) lient chacun des membres anti-apoptotiques avec la même affinité. Les autres membres pro-apoptotiques inducteurs sont spécifiques de certains membres anti-apoptotiques. **(B)** Profil d'interaction des membres anti-apoptotiques (bleu) avec les membres pro-apoptotiques effecteurs (brun) (*Simmons et al., 2008; Willis and Adams, 2005; Willis et al., 2005*).

Comme les membres pro-apoptotiques inducteurs, les membres pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak interagissent avec les membres anti-apoptotiques avec des spécificités différentes. Alors que Bax se lie à tous les membres anti-apoptotiques, Bak se lie préférentiellement à Bcl-x_L et Mcl-1, mais pas à Bcl-2, Bcl-w et A1. Ces interactions ont été démontrées par double hybride chez la levure, puis par Biacore et co-immunoprécipitation dans des cellules épithéliales humaines de rein 293T (*Willis et al., 2005*). Une étude récente montre que Bak est également capable de lier Bfl-1 (*Simmons et al., 2008*). L'étude de *Simmons et al.* n'est pas en contradiction avec celle de *Willis et al.* car ces derniers ont montré que Bak ne se liait pas à A1, l'homologue murin de Bfl-1, sans étudier la capacité de Bak à lier Bfl-1.

Enfin, les membres pro-apoptotiques inducteurs et effecteurs peuvent interagir entre eux. Cependant, les spécificités d'interaction entre les membres pro-apoptotiques ne sont toujours pas clairement définies. Une étude montre que Bax se lie aux peptides correspondants aux BH3 de tBid et Bim, mais pas de Bik, Bmf, Hrk, Bad, Noxa et Puma (*Willis et al., 2007*). En revanche, des études récentes rapportent que Bmf, Noxa et Puma sont capables d'activer Bax ou Bak (*Cartron et al., 2004; Du et al., 2011; Gallenne et al., 2009*). De plus, un état particulier de Bax serait nécessaire pour la liaison avec tBid ou Bim, car le peptide correspondant au BH3 de Bim ou de Bid ne reconnaît pas une forme naïve de Bax, mais reconnaît plutôt une conformation particulière de la protéine (*Willis et al., 2007*). La

résolution de la structure tridimensionnelle du complexe entre le domaine BH3 de Bim et Bax indique que le domaine BH3 de Bim ne se lie pas dans la poche hydrophobe de Bax à la place de son domaine C-terminal, comme c'est le cas des partenaires anti-apoptotiques de Bim. Par contre, le domaine BH3 de Bim se reconnaît une autre surface d'interaction à la surface de Bax qui s'apparente à la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques (*Gavathiotis et al., 2008*). L'ensemble de ces études illustre la complexité d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2.

Les différents profils d'interaction présentés ci-dessus sont les plus retrouvés, mais peuvent être controversés. Les résultats obtenus *in vitro* avec des protéines solubles sont influencés par le tampon utilisé qui peut moduler la conformation protéique. En utilisant trois techniques expérimentales différentes, *Zhai et al.* ont observé que ces profils d'interaction peuvent être reproduits dans deux techniques, mais rarement dans les trois techniques (*Zhai et al., 2008a*). Selon le type cellulaire et les techniques expérimentales utilisées de nouvelles interactions peuvent être confirmées ou au contraire démenties. Comme ces études ont été réalisées dans des modèles d'expression exogène, il serait intéressant de démontrer ces interactions dans des modèles d'expression endogène.

Par ailleurs, par leur différence de sensibilité d'interaction avec les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques sont complémentaires. Ces caractéristiques se retrouvent également au niveau fonctionnel. L'infection de fibroblastes d'embryon de souris par des rétrovirus exprimant Bim ou Puma induit fortement la mort cellulaire tandis que l'expression de Bmf, Bad, Bik, Hrk ou de Noxa induit une faible mortalité cellulaire. De plus, l'expression simultanée de Bad et de Noxa, qui inhibent respectivement Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w et Mcl-1, Bfl-1, induit un taux de mortalité cellulaire comparable à celui induit par Bim ou Puma seul (*Chen et al., 2005*). Par conséquent, une mort cellulaire efficace est observée lorsque l'ensemble de membres anti-apoptotiques est neutralisé par un ou plusieurs membres pro-apoptotiques. Ces données suggèrent également qu'en plus de la grande disparité d'affinité entre les membres de type BH3 et les anti-apoptotiques, ces derniers présentent des rôles biologiques différents. Par exemple, les radiations UV induisent la dégradation de Mcl-1, mais pas celle de Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w dans des HeLa (*Willis et al., 2005*).

2-2-1c/ Régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2

L'apoptose est le résultat d'une cascade d'évènements dont les membres pro-apoptotiques inducteurs sont les premiers membres de la famille Bcl-2 activés. Cette cascade d'activation aboutie à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), une étape de l'apoptose considérée comme irréversible. Cette étape est induite par Bax et Bak qui sont capables de former un pore dans la membrane mitochondriale. Au moins deux études placent les membres pro-apoptotiques de type BH3 en amont de Bax et Bak. L'une montre dans des MEF que les délétions simultanées de Bax et Bak, mais pas celles de Bid et Bim, inhibent l'apoptose induite par un traitement aux UV ou à l'étoposide (*Willis et al., 2007*). L'autre étude montre que la surexpression de Bim ou Bad ne sensibilise pas l'apoptose des MEF déficients pour Bax et Bak (*Zong et al., 2001*). Nous verrons dans ce chapitre que l'activité pro-apoptotique de Bax et Bak est régulée à la fois par les membres anti-apoptotiques qui les inhibent et les membres pro-apoptotiques de type BH3 qui les activent (*Figure 21*).

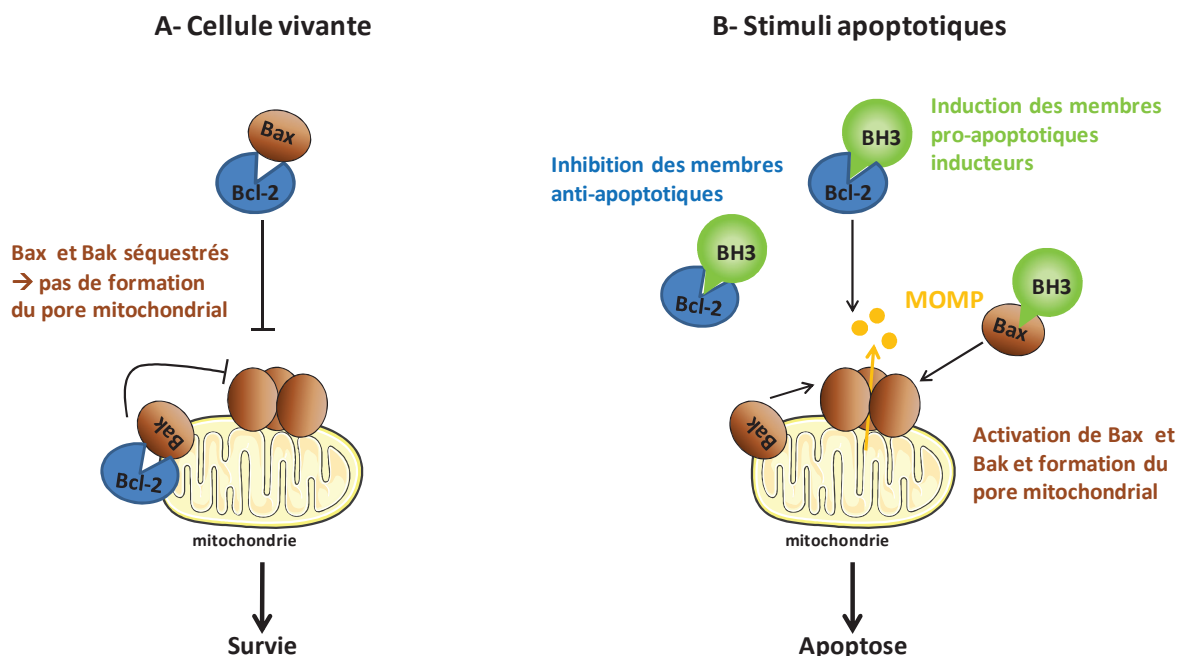


Figure 21 : Régulation des membres effecteurs Bax / Bak par les membres de la famille Bcl-2

(A) Dans une cellule vivante, les membres anti-apoptotiques inhibent les membres pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak. **(B)** Lors d'un signal apoptotique, les membres pro-apoptotiques inducteurs peuvent activer directement Bax et Bak et/ou inhiber l'activité des membres anti-apoptotiques, conduisant à la MOMP (perméabilisation de la membrane externe mitochondriale).

Activation de Bax et Bak et formation du pore mitochondrial

Bien que la manière dont Bax et Bak sont activées soit controversée, leur implication dans la formation du pore ne l'est pas. Les stimuli apoptotiques induisent la translocation de Bax à la mitochondrie où la protéine s'insère dans la membrane mitochondriale externe comme une protéine membranaire. Bax forme alors des oligomères représentant les pores mitochondriaux (Figure 21).

Lors d'un signal apoptotique, Bax sous forme soluble peut être directement activée par une interaction avec des membres pro-apoptotiques de type BH3 Bid et Bim. En effet, des peptides correspondant aux domaines BH3 de Bid et Bim induisent l'oligomérisation de Bax et Bak et activent la formation du pore dans des mitochondries isolées ou des liposomes (Kuwana *et al.*, 2005; Kuwana *et al.*, 2002; Letai *et al.*, 2002). Lovell *et al.* proposent un modèle séquentiel dans lequel la liaison de tBid à la membrane mitochondriale permettrait le recrutement de Bax conduisant à un changement de conformation. Bax pourrait ainsi s'insérer dans la membrane mitochondriale externe et s'oligomériser pour former le pore mitochondrial (Leber *et al.*, 2007; Lovell *et al.*, 2008).

Cependant, l'apoptose dépendante de Bax/Bak en absence de Bid et Bim a été observée, suggérant l'implication d'autres facteurs dans la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par Bax/Bak (Willis *et al.*, 2007). Comme vu précédemment, Bmf, Noxa et Puma pourraient activer Bax ou Bak (Cartron *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2011; Gallenne *et al.*, 2009). L'implication de cardiolipin, de VDAC (voltage-dependent anion channel) ou d'autres protéines membranaires mitochondriales encore non identifiées a également été proposée dans la régulation de l'activité de Bax ou Bak (Schafer *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle de VDAC est controversé par une étude effectuée sur des souris déficientes pour les deux isoformes VDAC1 et VDAC3 et qui n'ont pas montré de défaut d'apoptose (Baines *et al.*, 2007). L'activation de Bax et Bak pourrait également être induite par des facteurs non protéiques, tels que la chaleur, les détergents ou un pH élevé.

En conclusion, l'activation de Bax et Bak conduit séquentiellement à la perméabilisation de la mitochondrie, à l'export du cytochrome c, à l'activation des caspases

et à l'apoptose. La translocation de Bax, bien que réversible dans certaines situations, corrèle généralement avec l'étape irréversible de la libération du cytochrome c.

Modèles d'activation Bax/Bak par les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Plusieurs modèles décrivant l'interaction des protéines Bax/Bak avec les membres pro-apoptotiques inducteurs et avec les membres anti-apoptotiques ont été proposés. Ces modèles ont été ensuite adaptés pour prendre en compte les nouvelles découvertes scientifiques dont la complexité des profils d'interaction. Les derniers modèles actuellement admis sont présentés ci-dessous.

Selon leurs fonctions, les membres pro-apoptotiques inducteurs peuvent appartenir à l'une des trois catégories suivantes : activateur, sensibilisateur ou dé-répresseur. Bid et Bim sont dits activateurs car ils peuvent activer directement Bax et Bak. Par contre, Bik, HRK, Noxa et Puma ne se lieraient pas directement à Bax et Bak, mais plutôt aux membres anti-apoptotiques. Ils sont dits sensibilisateurs ou dé-répresseurs selon qu'ils sensibilisent les cellules à l'apoptose ou abolissent l'effet inhibiteur des anti-apoptotiques (Figure 22A). L'ensemble des études concernant l'activité des membres de la famille Bcl-2 a permis de proposer 3 scénarii (Chipuk et al., 2010) (Figure 22B, 23 et 24).

A- Classification des membres pro-apoptotiques

Membres de type BH3 sensibilisateurs / dé-répresseurs

Bad, Bik, Bmf, Hrk, Puma, Noxa,

Membres de type BH3 activateurs

Bim, tBid

Membres effecteurs

Bax, Bak

B- Modèle de Sensibilisation

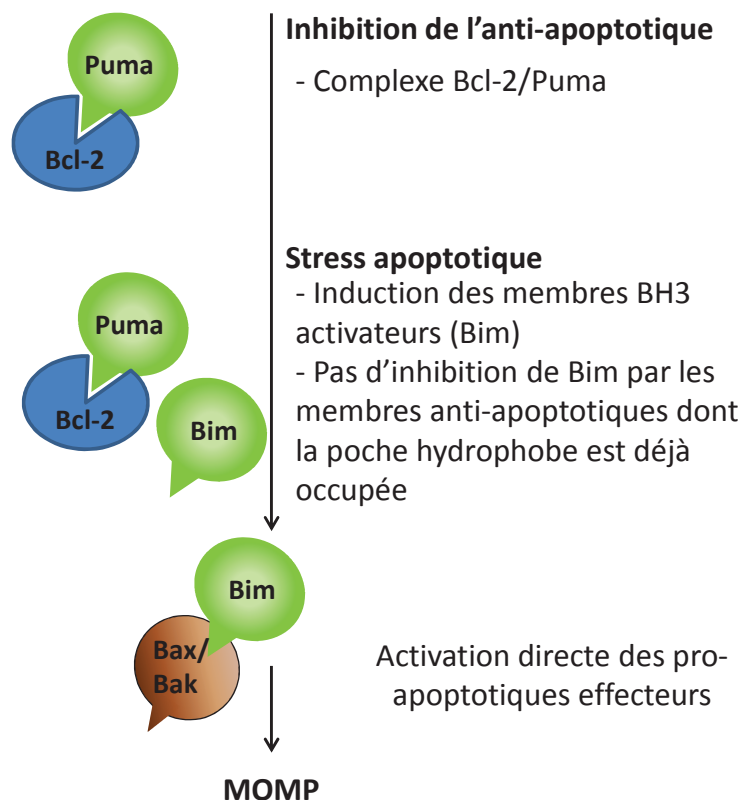


Figure 22 : Modèle de sensibilisation

(A) Classification des membres pro-apoptotiques. **(B)** Modèle de sensibilisation : les membres anti-apoptotiques Bcl-2 séquestrent les membres de type BH3 sensibilisateurs (comme Puma) et ne sont pas disponibles pour lier les membres de type BH3 activateurs (comme Bid ou Bim). Le seuil d'activation de Bax et Bak et de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) est donc diminué. Suite à un signal apoptotique, les membres de type BH3 activateurs activent alors directement Bax et Bak, conduisant à la MOMP (D'après (Chipuk et al., 2010)).

Modèle de dé-répression

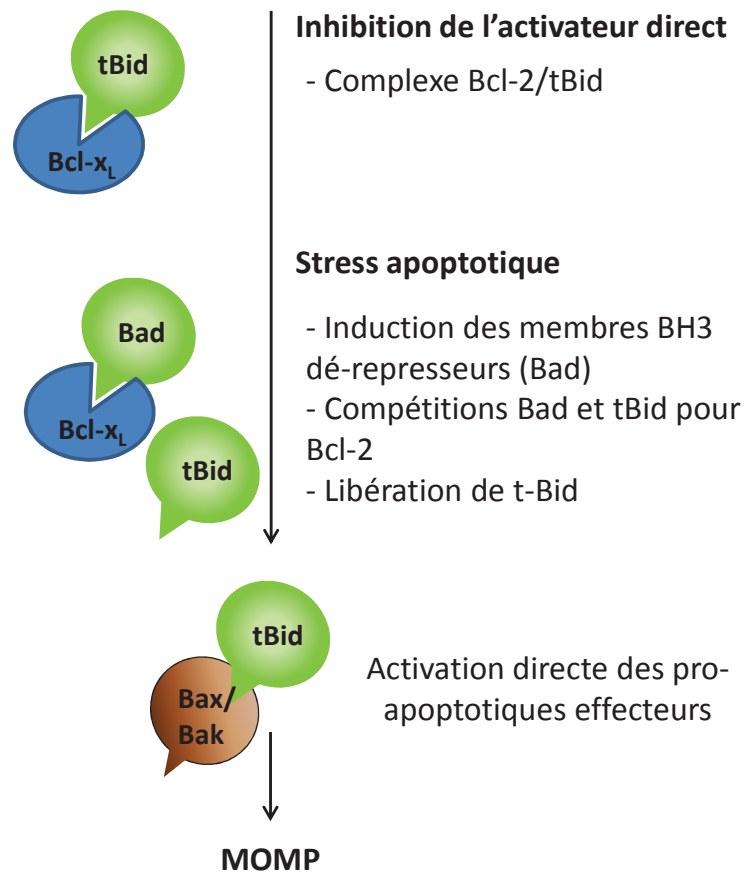


Figure 23 : Modèles de dé-répression

Les membres de type BH3 activateurs sont séquestrés par les membres anti-apoptotiques. Un stress apoptotique induit l'expression des membres de type BH3 dé-represseurs qui, en se liant aux membres anti-apoptotiques, libèrent les membres de type BH3 activateurs. Ces derniers peuvent alors activer les membres effecteurs Bax et Bak et la MOMP. MOMP = perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (D'après (Chipuk et al., 2010; Lovell et al., 2008)).

Modèle de neutralisation

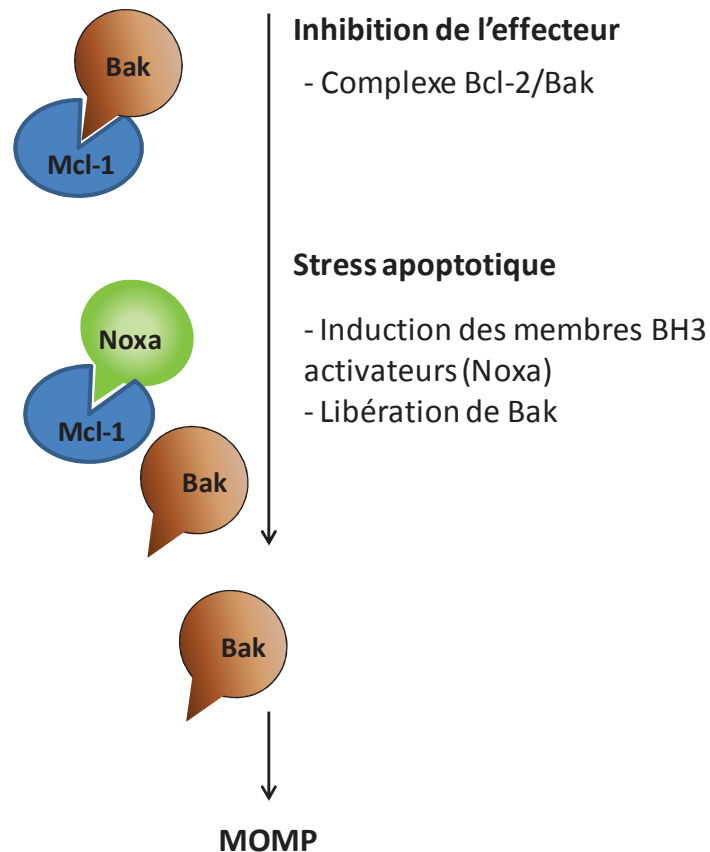


Figure 24 : Modèle de neutralisation

Les membres effecteurs sont séquestrés par les membres anti-apoptotiques. Un stress apoptotique induit l'expression des membres de type BH3 inducteurs qui, en se liant aux membres anti-apoptotiques, libèrent les membres pro-apoptotiques effecteurs, conduisant à la MOMP. MOMP = perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (D'après (Chipuk et al., 2010; Willis et al., 2005)).

Le modèle de neutralisation repose donc sur le fait que les formes libres de Bax et Bak soient actives. Ce modèle est possible puisque les interactions entre tBid ou Bim et Bax ne sont pas nécessaires pour induire la libération de cytochrome c et la mort cellulaire des cellules MEF. En revanche, les interactions entre tBid ou Bim et les membres anti-apoptotiques sont indispensables pour induire l'apoptose et la libération du cytochrome c dans les cellules MEF (Willis et al., 2007). Cependant, ce phénomène serait amplifié en présence de membres de type BH3 sensibilisateurs ou dé-répresseurs (Merino et al., 2009). Ceci suggère que l'ensemble de ces modèles peut coexister. Dans les cellules saines, les membres anti-apoptotiques pourraient lier l'ensemble des membres pro-apoptotiques

(effecteurs, activateurs, sensibilisateurs, dé-répresseurs), exprimés à un niveau basal, afin d'inhiber leur activité et d'éviter toute apoptose non contrôlée. L'induction de l'expression des membres pro-apoptotiques de type BH3 suite à un stimulus apoptotique augmenterait la quantité de membres pro-apoptotiques effecteurs libres ou activés nécessaire à l'induction de l'apoptose.

L'expression d'au moins un des six membres anti-apoptotiques permet la survie de la cellule. Pour que l'apoptose soit efficace, tous les membres anti-apoptotiques exprimés par la cellule doivent donc être inhibés simultanément. En effet, cibler simultanément les membres de type Mcl-1 par Noxa et ceux de type Bcl-x_L par Bad est nécessaire pour induire l'apoptose des cellules d'après l'étude de Du *et al.* De plus, l'inhibition ou la répression d'un membre anti-apoptotique peut être compensée par l'induction d'un autre membre anti-apoptotique. Par exemple, l'induction de Bfl-1 permet la survie des neutrophiles suite au traitement par le TNF- α qui réprime l'expression de Mcl-1 (Cross *et al.*, 2008). Bcl-x_L sous forme de dimère cytosolique servirait de réserve de protéines anti-apoptotiques dans la cellule. La dégradation de Mcl-1 par un stimulus apoptotique libère Bak qui rompt les dimères Bcl-x_L et reste donc inactif sous forme de dimères Bcl-x_L/Bak (Jeong *et al.*, 2004). Dans ce cas, l'expression de Bcl-x_L compense la dégradation de Mcl-1 et permet le maintien en vie de la cellule.

2-2-1d/ Régulation de l'expression et de l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Le rôle des membres de la famille Bcl-2 est essentiel dans le maintien de l'homéostasie lymphocytaire. Pour maintenir cet équilibre, leur expression et leur activité sont rigoureusement régulées. Certains exemples concernant la régulation des membres anti-apoptotiques sont illustrés dans ce chapitre, et en particulier celui de Bfl-1 et de Bcl-x_L lorsqu'ils ont été décrits.

Régulation transcriptionnelle

L'expression des membres anti-apoptotiques est induite suite à l'engagement de signaux de survie impliquant des récepteurs extracellulaires pour des molécules d'activation ou des cytokines. En aval, des voies de signalisation intracellulaires, comme les voies NF- κ B et AP-1, activent l'expression des membres anti-apoptotiques.

L'engagement du récepteur CD40 induit l'expression de Bcl-x_L via la voie NF- κ B (Cheng et al., 2000; Kater et al., 2004; Lee et al., 1999), conférant aux cellules B normales une résistance à l'apoptose induite par Fas (Lee et al., 1999). Le promoteur de *bcl-x_L* contient notamment deux sites NF- κ B activés par le facteur p65 (Lee et al., 1999). Par ailleurs, une perte de l'expression de Bcl-x_L ou de Bfl-1 est observée dans des cellules épithéliales A549 déficientes pour la voie NF- κ B en présence de TNF- α , démontrant que la cytokine TNF- α induit l'expression de Bcl-x_L et de Bfl-1 via la voie NF- κ B (Cheng et al., 2000). De plus, l'expression de Bcl-x_L peut être régulée par la voie AP-1. En effet, l'activation de l'expression de Bcl-x_L par le facteur de croissance VEGF nécessite la formation du dimère c-Jun/ATF2, dans des cellules humaines endothéliales et dans des fibroblastes murins (Salameh et al., 2010).

Le gène codant pour Bfl-1, localisé sur le chromosome 15q24.3, est rapidement et transitoirement induit par des stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α , la molécule CD40L ou le LPS dans des cellules B ou un ester de phorbol dans une lignée cellulaire T Jurkat. Le gène codant pour Bfl-1 a initialement été décrit comme une cible directe de la voie NF- κ B suite au traitement par le TNF- α (Cheng et al., 2000; Wang et al., 1999; Zong et al., 1999) ou à l'engagement de CD40 dans des lignées de cellules B (Lee et al., 1999). Depuis, l'implication de la voie NF- κ B dans l'activation de l'expression de Bfl-1 a été largement documentée dans des lignées cellulaires de macrophages, des lignées cellulaires pancréatiques, épithéliales humaines d'adénocarcinome de poumon A549, du cancer de la prostate, de cancer de la vessie, de lymphome d'Hodgkin, de LBCL (large B-cell lymphoma humaine), des cellules primaires LLC-B, des cellules T Jurkat et des neutrophiles (Cheng et al., 2000; Cross et al., 2008; Grumont et al., 1999; Kater et al., 2004; Kim et al., 2005; Kim et al., 2004; Kim et al., 2009; Loughran et al., 2011; Pagliari et al., 2000; Sarkar et al., 2009; Zhou et al., 2007). Dans les lignées cellulaires de cancer de la prostate, Bfl-1 est

exprimée au niveau messager suite au traitement par le TNF- α , protégeant ainsi les cellules de l'apoptose induite par cette cytokine. Des essais luciférase utilisant le promoteur de *bfl-1* contrôlant l'expression de la luciférase montrent qu'un inhibiteur de IKK inhibe l'activation du promoteur de *bfl-1* par le TNF- α . Au contraire, le facteur de transcription C/EBP β -A (CCAAT/enhancer-binding protein β isoform A) augmente l'activation du promoteur de *bfl-1* par le TNF- α . Par conséquent, l'activation de l'expression de Bfl-1 par le TNF- α implique non seulement la voie NF- κ B, mais également le facteur de transcription C/EBP β -A dans ce contexte (Kim et al., 2009). Le gène codant pour Bfl-1 est également sensible aux ROS (reactive oxygen species) qui induisent des oxydants, tels que l'eau oxygénée H₂O₂ en réponse à certains stimuli. Dans des cellules Jurkat, il a été démontré que l'eau oxygénée induit l'expression de Bfl-1 via le complexe p65/p50 de la voie NF- κ B, protégeant les cellules de l'apoptose induite par Fas (Kim et al., 2005). Au niveau des sites inflammatoires, les neutrophiles et les macrophages produisent et sécrètent une faible quantité d'eau oxygénée qui pourrait favoriser la survie des cellules du système immunitaire en activant l'expression de Bfl-1.

L'étude des mécanismes moléculaires de l'expression de Bfl-1 dans un modèle de lignées T activées par le traitement PMA et ionomycine a mis en évidence l'implication des voies NF- κ B et AP-1 dans la formation séquentielle d'un complexe de type « enhanceosome » (Edelstein et al., 2003) (Figure 25). La liaison du dimère c-Rel/p50 de la voie NF- κ B suivie de celle des facteurs de transcription c-Jun, c-Fos de la famille AP-1 et C/EBP β , puis du facteur de modelage de la chromatine HMGI-C, et enfin du coactivateur p300 sur la région -933/-773 du promoteur de *bfl-1* induirait l'activation de l'expression de ce gène. La formation de cet « enhanceosome » permet l'acétylation des histones, favorisant l'accès des cofacteurs de la transcription et de l'ARN polymérase au promoteur de *bfl-1*. Le rôle de c-Rel a également été retrouvé dans une lignée B (LBCL) suite à l'engagement de CD40 (Zhou et al., 2007). Des essais de précipitation de la chromatine ont permis de montrer la présence du récepteur CD40 nucléaire et de c-Rel sur le promoteur de *bfl-1*. Dans ce modèle, le récepteur CD40 nucléaire interagit directement avec c-Rel, mais pas avec p65. Dans un autre type cellulaire comme des macrophages primaires, le dimère p65/p50 de la voie NF- κ B serait impliqué dans l'induction de l'expression de *bfl-1* (Pagliari et al., 2000).

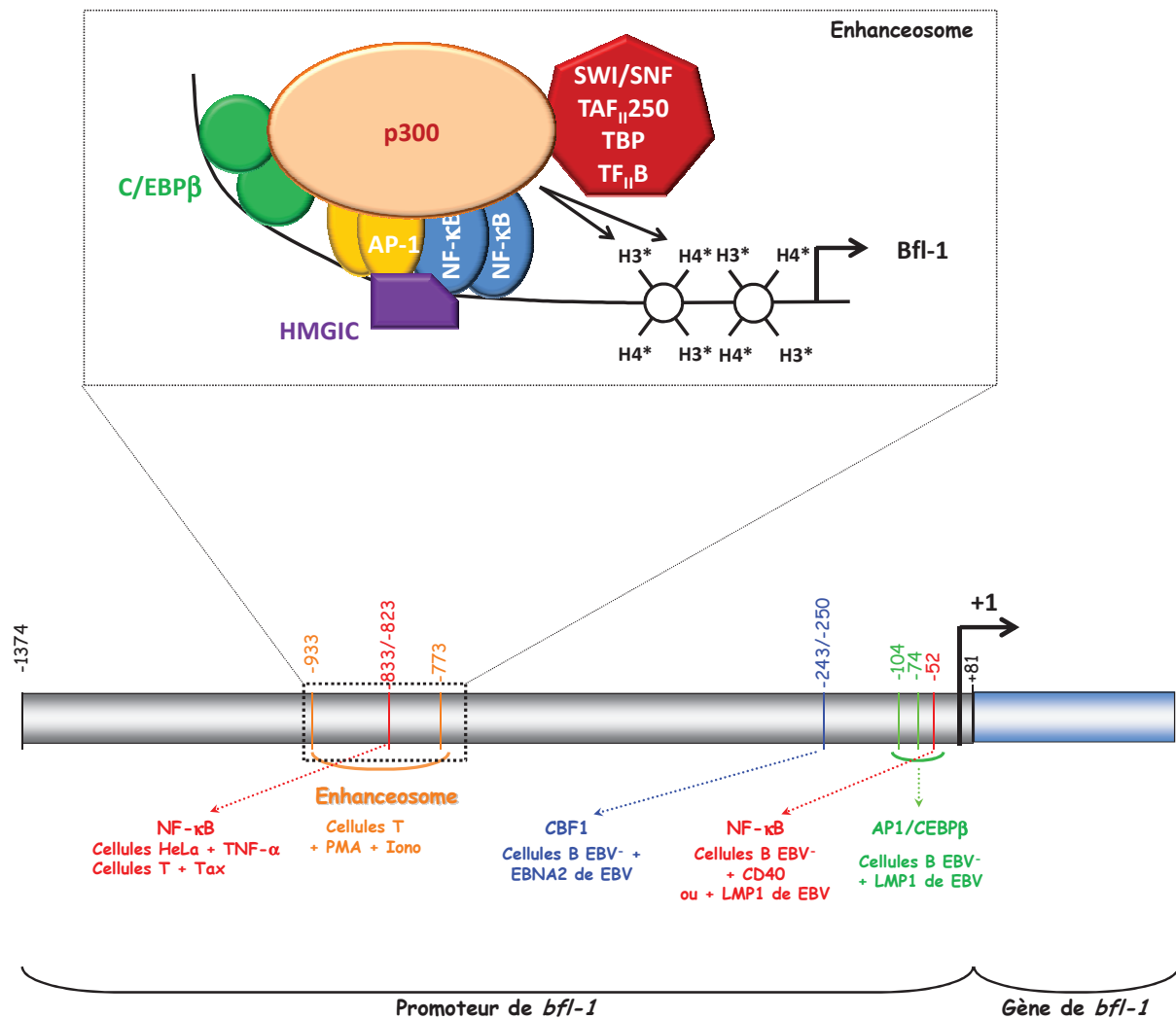


Figure 25 : Régulation de la transcription de *bfl-1*

Le schéma du promoteur de *bfl-1* représente les sites de liaison aux facteurs de transcription répertoriés (D'Souza et al., 2004; de la Fuente et al., 2003; Edelstein et al., 2003; Pegman et al., 2006; Zong et al., 1999). Les conditions dans lesquelles les sites consensus ont été identifiés (types cellulaires et stimuli) sont indiquées. Un modèle d'activation du promoteur de *bfl-1* dans des cellules T a été proposé (Edelstein et al., 2003). Ce modèle fait intervenir un complexe « enhanceosome » permettant le désassemblage des nucléosomes et le recrutement des cofacteurs de transcription et le l'ARN pol II. PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate, Iono = ionomycine.

L'expression de Bcl- x_L et de Bfl-1 peut également être modulée par des protéines virales. La protéine LMP2A de EBV induit l'expression de Bcl- x_L dans des cellules tumorales B de souris transgéniques exprimant LMP2A (Bultema et al., 2009; Portis and Longnecker, 2004). De plus, suite à l'infection par HTLV-1, la transcription de *bcl-x_L* est activée via les voies CREB/ATF et NF-κB par la protéine virale Tax (Mori et al., 2001; Mori et al., 2002; Nicot et al., 2000).

Dans des modèles de lignées cellulaires B, la surexpression de la protéine virale transactivatrice EBNA2 active l'expression de Bfl-1. Ce mécanisme, indépendant de la voie NF- κ B, nécessite l'interaction entre EBNA2 et le répresseur CBF1 (*Pegman et al., 2006*). L'étude montre également qu'en absence de EBNA2, la protéine virale LMP1 permet de maintenir une forte expression du messenger de *bfl-1* dans les cellules infectées par EBV. En effet, LMP1 active le promoteur de *bfl-1* via la voie NF- κ B (impliquant p65 mais pas c-Rel ni p50). LMP1 active en particulier la région -129/+81 où sont présents deux sites de type AP-1 et un site de type NF- κ B (**Figure 25**) (*D'Souza et al., 2004*). Enfin, dans le modèle d'infection par HTLV-1, il a été montré que Tax active le promoteur de *bfl-1* via un site NF- κ B en position -833 (**Figure 25**) (*de la Fuente et al., 2003*). Les auteurs d'une revue précisent, sans présenter de résultats, que l'activation de la voie NF- κ B n'est pas suffisante à la transactivation du gène codant pour Bfl-1 par Tax (*Silbermann and Grassmann, 2007*).

Epissage alternatif

Certains gènes de la famille Bcl-2 codent pour des formes anti- ou pro-apoptotiques en fonction de l'isoforme exprimée après épissage alternatif. C'est le cas du gène *bcl-x* dont la forme courte Bcl-x_s est pro-apoptotique (*Boise et al., 1993*). En effet, il a été décrit que la surexpression de Bcl-2 induit la survie des cellules murines FL5.12 en absence de facteur de croissance. Dans ces cellules, l'expression de Bcl-x_s inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en absence de facteur de croissance. Bcl-x_s joue donc un rôle dominant par rapport à Bcl-2 pour induire l'apoptose. Les mécanismes de régulation des deux formes Bcl-x_L et Bcl-x_s ne sont pas déterminés. La forme courte pourrait être favorisée pendant l'apoptose par des mécanismes encore mal définis.

Bfl-1 diffère des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 puisque ses deux isoformes, une forme courte minoritaire Bfl-1_s et une forme longue majoritaire Bfl-1, conservent une fonction anti-apoptotique. La forme courte diffère de la forme entière par la présence de l'exon II et par sa localisation au niveau du noyau (*Ko et al., 2003*) (**Figure 26A**).

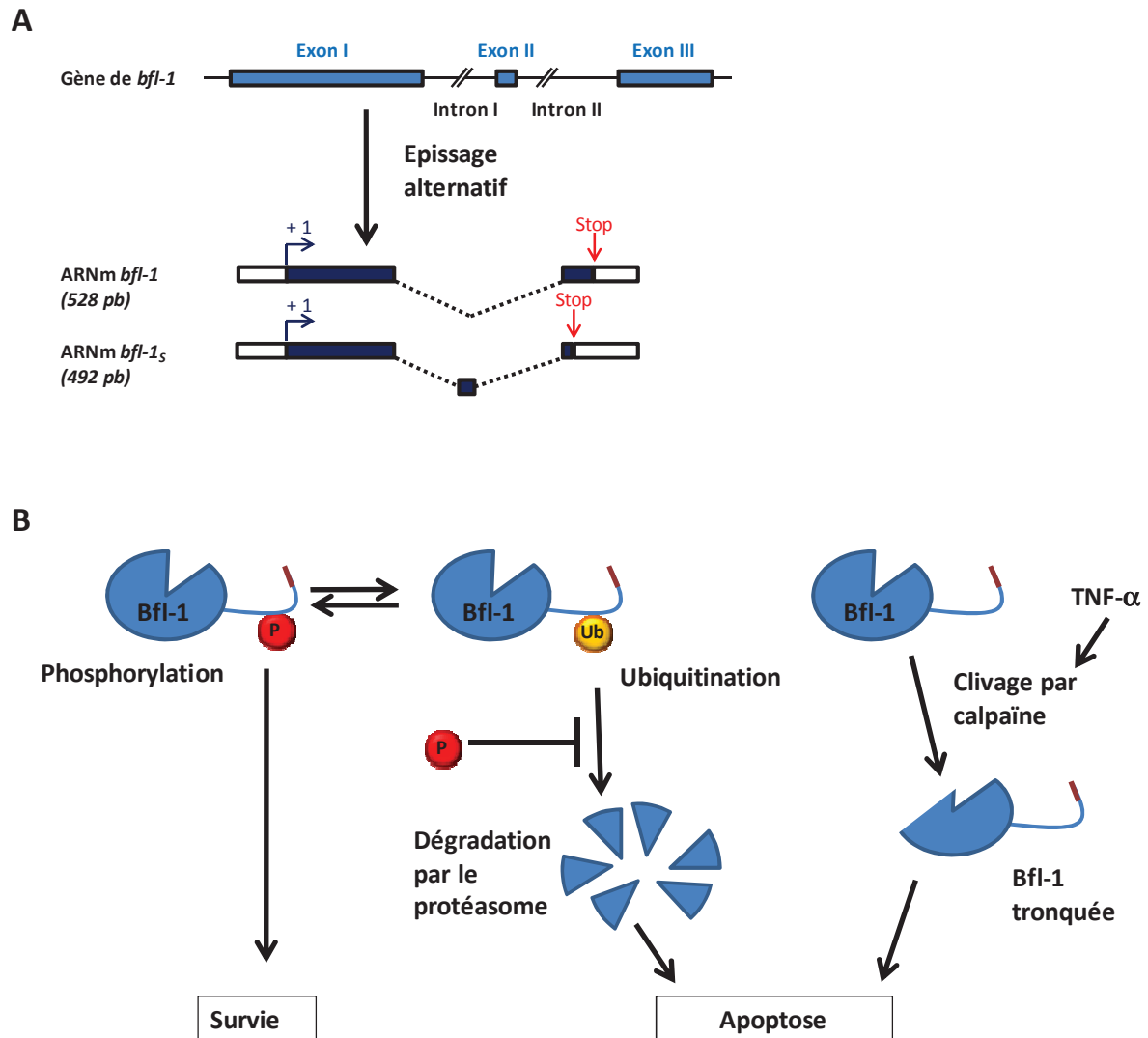


Figure 26 : Régulation de l'expression et de la stabilité de Bfl-1

(A) Le gène codant pour Bfl-1 code pour deux isoformes anti-apoptotiques suite à un épissage alternatif (d'après (Ko et al., 2003)). (B) La stabilité de la protéine Bfl-1 est contrôlée par les modifications post-traductionnelles. L'ubiquitination de la partie C-terminale favorise la dégradation protéique par le protéasome et est responsable de la faible demi-vie de Bfl-1 (Fan et al., 2010; Kucharczak et al., 2005). Ce phénomène est réprimé par la phosphorylation de Bfl-1 qui stabilise la protéine et favorise par conséquent la survie des cellules (Kucharczak et al., 2005). Suite à des stimuli apoptotique comme la cytokine TNF- α , l'activation de la calpaïne clive Bfl-1, conduisant à une forme pro-apoptotique de Bfl-1 contenant les domaines BH1-3 (Ko et al., 2007; Kucharczak et al., 2005).

Régulation post-transcriptionnelle

L'ARNm de Bcl-2 contient des séquences AREs (AU-rich element). Ces séquences AREs sont impliquées dans la dégradation de l'ARNm à partir de la séquence polyA en 3'. Il a été montré que la ribonucléoprotéine Nucleine se lie aux séquences AREs de l'ARNm de Bcl-2, empêchant le processus de dégradation (Willimott and Wagner, 2010).

La dégradation des ARNm est également contrôlée par les microARNs (miARNs). L'ARNm de Bcl-x_L est une cible directe de nombreux miARNs. En particulier, Let-7 réprime l'expression de Bcl-x_L. Une faible expression de Let-7 a notamment été observée dans des lignées cellulaires d'hépatome et des tissus humains de carcinomes hépatocellulaires et serait impliquée dans la surexpression de Bcl-x_L dans ces cellules (*Shimizu et al., 2010*).

Par ailleurs, les ARNm de Bcl-2 et de Bcl-x_L contiennent des séquences IRES (internal ribosome entry sequence) dans leur 5'-UTR permettant d'initier la traduction même en l'absence de cap. L'IRES est un élément structuré localisé dans le 5'-UTR des ARNm sur lequel se lie la sous-unité ribosomale 40S permettant l'initiation de la traduction. La séquence 5'-UTR des ARNm de Bfl-1, Mcl-1 et Bcl-w étant courte, ces ARNm ne possèderaient pas de séquence IRES. Bfl-1 contient une courte séquence 3'-UTR (200 pb) par comparaison à Bcl-2 (5 kpb), suggérant que l'expression des membres anti-apoptotiques est régulée de manière différente (*Willimott and Wagner, 2010*).

Modifications post-traductionnelles

Bcl-x_L peut être phosphorylée sur la Ser62, la Thr47 et la Thr115 (*Basu and Haldar, 2003; Kharbanda et al., 2000; Upreti et al., 2008*). La phosphorylation de la Ser62 semble être la modification majoritaire de Bcl-x_L suite à des inhibiteurs des microtubules, comme la vinblastine. Cette phosphorylation inhibe la capacité de Bcl-x_L à lier Bax, induisant la libération de Bax et l'apoptose (*Upreti et al., 2008*). En réponse à des dommages à l'ADN, l'Asp66 de Bcl-x_L peut subir une déamination, soit une perte du groupement NH₂, inhibant l'activité anti-apoptotique de Bcl-x_L (*Deverman et al., 2002; Upreti et al., 2008*). Enfin, la clivorine, une hépatotoxine naturelle, induit l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome de Bcl-x_L, conduisant à l'apoptose de la lignée humaine L-02 de foie adulte et des hépatocytes murins (*Ji et al., 2008*).

Bfl-1 est ubiquitinylée non pas dans sa partie N-terminale, mais dans sa partie C-terminale. L'ubiquitinylation de Bfl-1 est responsable de la dégradation de Bfl-1 par le protéasome et de sa courte demi-vie. Ce phénomène peut être réprimé par la phosphorylation qui stabilise la protéine (*Kucharczak et al., 2005*) (Figure 26B). Par ailleurs, un défaut d'ubiquitination de Bfl-1 favoriserait le développement de cancer *in vivo* (*Fan et*

al., 2010). En effet, des cellules murines pro-B FL5.12 exprimant des mutants de Bfl-1 défectifs pour l'ubiquitination ont été inoculées dans des souris Nude, dépourvues de lymphocytes T matures. Après inoculation, ces souris ont développé entre autres une splénomégalie massive, alors que les souris Nude inoculées avec des cellules FL5.12 exprimant Bfl-1 sauvage n'ont pas développé de pathologie. Comme certains mutants de Bfl-1 diffèrent par leur localisation cellulaire et leur capacité à interagir avec Bak ou Noxa, mais conservent un défaut d'ubiquitination, cette étude implique clairement l'augmentation de la stabilité de Bfl-1 par un défaut d'ubiquitination dans le développement de tumeurs.

Clivage protéolytique

Certains membres anti-apoptotiques peuvent devenir pro-apoptotiques suite au clivage de leur partie N-terminale. Bcl-2 et Bcl-x_L sont clivées par la caspase 3 conduisant à une forme pro-apoptotique de Bcl-2 (*Kutuk and Letai, 2008*). De même, Mcl-1 est clivée par des caspases ou le Granzyme B.

Bfl-1, quant à elle, est clivée entre les domaines BH3 et BH4 par la calpaïne en réponse à une stimulation par le TNF- α dans des cellules pro-B murines (*Kucharczak et al., 2005*) (Figure 26B). Le peptide correspondant à la partie C-terminale de Bfl-1 présente une activité pro-apoptotique. Il a été montré que les trois acides aminés de la région hydrophobe sont nécessaires à l'activité pro-apoptotique de l'extrémité C-terminale de Bfl-1. Les auteurs proposent que ces trois acides aminés chargés seraient impliqués dans la formation d'un pore au niveau de la mitochondrie ou moduleraient l'activité de protéines mitochondriales conduisant à la perméabilité de la membrane externe mitochondriale (*Ko et al., 2007*). Cette activité pro-apoptotique intrinsèque de Bfl-1 serait masquée par le reste de la protéine et serait révélée suite au clivage de la partie N-terminale.

En conclusion, les membres de la famille Bcl-2 sont étroitement régulés pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Dans certaines conditions encore mal définies, des

modifications conduisent à des formes pro-apoptotiques de Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 et Bfl-1, favorisant l'apoptose. Ces mécanismes de régulation sont essentiels au contrôle de l'apoptose et peuvent être favorisés par des stimuli apoptotiques. Par conséquent, des défauts de dégradation des protéines anti-apoptotiques ou de leur conversion en membres pro-apoptotiques favorisent le développement de cancers.

2-2-2 Dérégulation de l'apoptose : développement d'hémopathies malignes et chimiorésistance

D'après Hanahan et Weinberg, la capacité des cellules cancéreuses à résister à l'apoptose est une des étapes nécessaires à la transformation maligne (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Comme dans le cas de l'ATLL, de nombreux cancers sont associés à une surexpression des membres anti-apoptotiques combinée à une répression des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'excès de membres anti-apoptotiques dans les cellules tumorales séquestrerait l'ensemble des membres pro-apoptotiques. Par conséquent, les membres pro-apoptotiques inducteurs activés par des stimuli naturels ou thérapeutiques seraient neutralisés et les cellules échapperaient à l'apoptose (Figure 27).

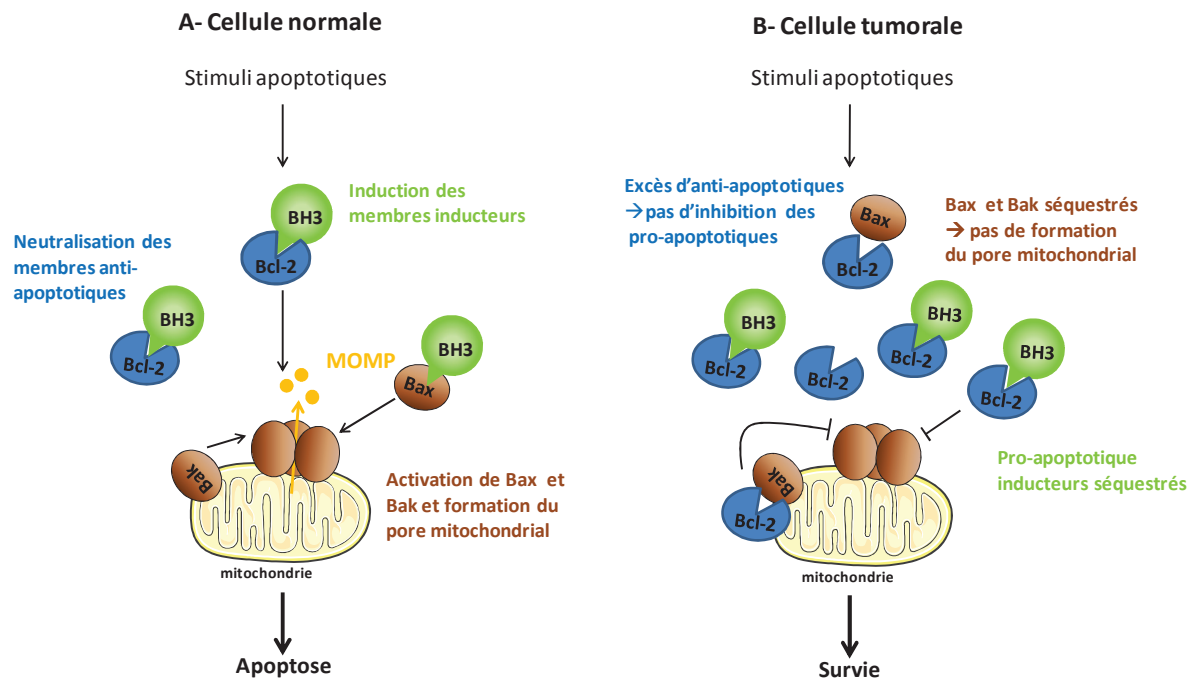


Figure 27 : La surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 maintient la survie des cellules tumorales

(A) Dans une cellule normale, des stimuli apoptotiques induisent l'expression des membres pro-apoptotiques inducteurs. Ces derniers neutralisent les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, conduisant à la MOMP et à l'apoptose. (B) Dans une cellule anormale, des stimuli apoptotiques induisent l'expression des membres pro-apoptotiques inducteurs qui sont séquestrés par les membres anti-apoptotiques surexprimés. L'excès de membres anti-apoptotiques permet de neutraliser l'ensemble des membres pro-apoptotiques effecteurs et inducteurs, maintenant la survie des cellules tumorales. MOMP = perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

Comme nous l'avons vu précédemment, des altérations génétiques peuvent être responsables de ces dérégulations et causer une résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses. Des oncogènes, comme certains membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, sont surexprimés suite à des modifications chromosomiques. Des mutations ponctuelles affectant leur séquence primaire et par conséquent leurs propriétés fonctionnelles sont également observées. Les gènes suppresseurs de tumeur, comme les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, peuvent perdre leur fonction suite à une délétion du gène ou à des mutations dans leur séquence primaire affectant leur fonction. Bien qu'une surexpression de Bcl-2 et plus rarement de Bcl-x_L soit associée à des translocations chromosomiques (Kirkin *et al.*, 2004; Tsujimoto *et al.*, 1984), aucune aberration chromosomique n'est associée à une surexpression de Mcl-1 ou de Bfl-1. L'activation constitutive des régulateurs de l'expression des membres de la famille Bcl-2,

comme les voies de signalisation intracellulaires, pourrait expliquer la surexpression des membres anti-apoptotiques et la répression des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 en l'absence d'altération génétique.

Bcl-2 est surexprimée dans 60% des lymphomes folliculaires B en raison de la translocation chromosomique t(14 ; 18). Depuis, Bcl-2 a été largement étudiée et sa surexpression est retrouvée dans de nombreux cancers dont des tumeurs solides comme le cerveau, le sein et les poumons, et des hémopathies malignes de type B dont les LLC-B (LLC à lymphocytes B), les DLBCL et les lymphomes de cellules du manteau (*Kelly and Strasser, 2011; Kirkin et al., 2004*). En plus des réarrangements chromosomiques, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 pouvait être associée à une hypo-méthylation de son promoteur (cas des LLC) ou à une inhibition de l'expression des miARNs qui régulent son expression, comme miR15a et miR16-1 (*Willimott and Wagner, 2010*).

Bcl-x_L et Mcl-1 sont également surexprimées dans plusieurs hémopathies, comme les myélomes humains et les leucémies myéloïdes chroniques, et dans des cancers solides, comme les carcinomes du foie ou du rein et le cancer du pancréas (*Kelly and Strasser, 2011*). Le caractère oncogénique de ces molécules a été révélé à l'aide de modèles murins. En particulier, des souris transgéniques surexprimant Mcl-1 présentent une forte incidence de lymphomes B. La surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peut être associée à une résistance aux traitements thérapeutiques. Une surexpression de Mcl-1 serait associée à la résistance à la vinblastine dans 13 lignées cellulaires de leucémies lymphomes et des cellules primaires issues de sept patients atteints de LLC (*Salerni et al., 2010*). De même, l'expression de Bcl-x_L pourrait être associée à la résistance au cisplatine et à l'adriamycine dans des cellules humaines d'adénocarcinome de poumon (*Cheng et al., 2000*). D'autres études confirment le rôle de Bcl-x_L dans la chimiorésistance (*Minn et al., 1995; Simonian et al., 1997*).

Une surexpression de Bfl-1 est observée dans différents types de cancers solides, comme les mélanomes, les cancers de l'estomac et du colon, et d'hémopathies comme les leucémies/lymphomes de type B (*Brien et al., 2007; Olsson et al., 2007*). Des analyses transcriptomiques ont révélé Bfl-1 comme gène signature de lymphome B à larges cellules

du médiastin (MLBCL), et du sous-type « OsPhos » (pour oxidative phosphorylation) de lymphome B diffus à larges cellules (DLBCL) (*Feuerhake et al., 2005; Mahadevan et al., 2005; Monti et al., 2005*) et de mélanomes malins (*Timar et al., 2010*). La surexpression de Bfl-1 serait en plus impliquée dans la chimiorésistance aux agents chimiothérapeutiques (*Cheng et al., 2000; Wang et al., 1999*). L'étoposide (inhibiteur de topoisomérase II humaine) induit une surexpression de Bfl-1 via la voie NF- κ B dans les lignées cellulaires de fibrosarcome HT080 et épithéliales humaines d'adénocarcinome de poumon (*Cheng et al., 2000; Wang et al., 1999*). Le cisplatine induit l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans des lignées cellulaires épithéliales humaines d'adénocarcinome de poumon (*Cheng et al., 2000*), dans des lignées cellulaires de cancer de la vessie et les cellules BOSC23 rénales humaines (*Kim et al., 2004*). Bfl-1 est également impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par le TNF- α dans des cellules humaines de carcinome du col de l'utérus HeLa (*Zong et al., 1999*).

Une surexpression de Bfl-1 permet de discriminer des patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) progressive et résistante aux chimiothérapies des patients atteints d'une LLC-B non progressive et indolente (*Morales et al., 2005*). Cette étude a été confirmée sur un échantillon de 37 patients par *Olsson et al.* qui ont observé une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Bfl-1 au niveau messager et la sensibilité *in vitro* à l'apoptose induite par la fludarabine dans des cellules B issues de patients atteints de LLC-B (*Olsson et al., 2007*). Par ailleurs, l'équipe de Nathalie Bonnefoy-Bérard a montré que l'inhibition de l'expression de Bfl-1 par ARN interférence induit l'apoptose des lignées lymphoblastoïdes B et les sensibilise à la mort cellulaire induite par des drogues chimiothérapeutiques conventionnelles (*Brien et al., 2007*). De la même manière, l'inhibition de l'expression de Bfl-1 par ARN interférence induit l'apoptose des cellules issues de quatre patients atteints de LLC-B et résistants à la fludarabine (*Olsson et al., 2007*).

Comme l'expression de Bcl-x_L et de Bfl-1 est activée par la voie NF- κ B, les inhibiteurs de la voie NF- κ B représentent un moyen d'inhiber les membres anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L (*Loughran et al., 2011; Mori et al., 2001*). Ainsi, dans des lignées cellulaires de lymphomes hodgkiniens, les inhibiteurs de la voie NF- κ B, comme Bay11-7082, un inhibiteur de la phosphorylation des I κ B, ou l'arsenite de sodium inhibent l'expression de Bfl-1, conduisant à l'apoptose (*Loughran et al., 2011*). De plus, l'expression ectopique de Bfl-1 inhibe l'apoptose induite par ces inhibiteurs de la voie NF- κ B. A l'inverse, l'inhibition de

l'expression de Bfl-1 par ARN interférence sensibilise les cellules à l'apoptose induite par les inhibiteurs de la voie NF- κ B. Par conséquent, l'expression de Bfl-1 médiée par la voie NF- κ B est impliquée dans la résistance à l'apoptose de ces cellules (*Loughran et al., 2011*). La chimiorésistance peut être acquise si les cellules cancéreuses sur-expriment Bfl-1 avant un traitement, ou intrinsèque si l'expression de Bfl-1 est induite par des agents chimiothérapeutiques (*Kim et al., 2004; Xia et al., 2006*).

Si le rôle anti-apoptotique de Bfl-1 a bien été documenté dans les hémopathies B, le rôle de Bfl-1 dans les leucémies/lymphomes de type T est peu documenté. Deux études suggèrent que la sur-expression de Bfl-1 peut contribuer au développement de leucémies aiguës lymphoïdes T (T-ALL) (*Mandal et al., 2005*) ou à leur chimiorésistance (*Ferrando et al., 2002*). Dans le cas de cancer T viro-induit, bien qu'une seule étude ait montré que la protéine virale Tax de HTLV-1 active le promoteur de *bfl-1* (*de la Fuente et al., 2003*), aucune étude n'a montré que la surexpression de Bfl-1 est responsable de la survie de leucémie/lymphome T.

En conclusion, une forte expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est observée dans les cancers, dont des hémopathies malignes. Par conséquent, le seuil de sensibilité aux membres pro-apoptotiques conduisant à l'activation de l'apoptose est élevé et les cellules cancéreuses échappent aux stimuli apoptotiques naturels.

Des agents cytotoxiques sont classiquement utilisés comme traitements chimiothérapeutiques anti-tumoraux. Ces agents, dits agents conventionnels, agissent au niveau de l'ADN (ex : fludarabine) ou des microtubules (ex : vincristine) pour induire l'apoptose de leurs cellules cibles. Il a été observé que les cancers qui répondent bien à un agent cytotoxique répondent généralement bien aux autres agents cytotoxiques bien que ces derniers aient des mécanismes d'action différents. A l'inverse, les cancers qui répondent faiblement à un type d'agent cytotoxique sont souvent résistants à toute forme de chimiothérapie conventionnelle. En s'appuyant sur ces constatations, le groupe de A. Letay a récemment mené une étude *in vitro* suggérant un rôle des membres de la famille Bcl-2 dans la résistance aux agents cytotoxiques conventionnels (*Ni Chonghaile et al., 2011; Reed, 2011*). Leurs travaux mettent en évidence un lien entre le seuil d'activation de Bax et Bak

conduisant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques. Lorsque ce seuil d'activation est faible, l'agent cytotoxique seul est efficace. A l'inverse, lorsque ce seuil est élevé, les cellules sont résistantes à la mort induite par l'agent cytotoxique. Cette résistance serait due à une surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 puisque l'inhibition de ces derniers par des agents chimiques ou des peptides représentant les domaines BH3 des membres pro-apoptotiques de type BH3 sensibilise les cellules à la mort induite par les agents cytotoxiques conventionnels. Les travaux de Letai *et al.* suggèrent donc que le prétraitement, avec des agents thérapeutiques dirigés contre les membres anti-apoptotiques sensibilise les cellules cancéreuses aux traitements thérapeutiques conventionnels. Aussi, les membres de la famille Bcl-2 sont des cibles pertinentes pour le développement de nouvelles stratégies anti-tumorales qui pourraient être utilisées seules ou combinées à la thérapie conventionnelle dans le but d'induire l'apoptose ou de sensibiliser les cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques conventionnels. Comme nous venons de le voir, l'expression de Bcl-1 pourrait être liée à la chimiorésistance de certains cancers, suggérant que des inhibiteurs de l'activité anti-apoptotique de Bcl-1 pourraient être combinés aux agents anti-tumoraux conventionnels pour traiter ces cancers, tels que les LLC-B.

2 – 3/ STRATEGIES CIBLANT LES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2

Plusieurs stratégies ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été développées. Une des stratégies développées est de réprimer l'expression des protéines anti-apoptotiques au niveau transcriptionnel avec des agents comme le sodium butyrate, des depsipeptides, la fenretinide ou le flavopiridol ou au niveau post-transcriptionnel par des ribozymes ou par ARN interférence (Kang and Reynolds, 2009). Le premier outil thérapeutique dirigé contre Bcl-2 étudié en phase clinique a été un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARN messager de Bcl-2. Cette stratégie a notamment été développée par la

société Gento Inc, puis par Aventis. Ces sociétés ont développé le G3139 ou Genasense ou encore Oblimersen qui est un phosphorothilate de 18 pb dirigé contre les six premiers codons de l'ARNm de Bcl-2. Ce traitement a donné des résultats prometteurs dans des modèles de souris et est actuellement en phase clinique III pour traiter entre autres des patients atteints de mélanomes ou de LLC (*Kang and Reynolds, 2009*).

Les chercheurs se sont également intéressés aux outils capables d'inhiber non plus l'expression de membres anti-apoptotiques, mais leur activité. Des inhibiteurs d'enzyme phosphorylant Bcl-2 ou encore des peptides mimétiques (également appelés peptidomimétiques) des domaines BH3 des membres pro-apoptotiques ont ainsi été développés. Par leur capacité à induire l'apoptose en se liant dans la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques, les peptides mimétiques des domaines BH3 des membres pro-apoptotiques ont prouvé l'intérêt de cibler la famille Bcl-2 pour restaurer la mort des cellules via l'inhibition de l'activité des membres anti-apoptotiques. Depuis plusieurs années, des petites molécules organiques ciblant les membres anti-apoptotiques ont prouvé leur efficacité *in vitro* et dans des modèles pré-cliniques (*Azmi et al., 2011; Chonghaile and Letai, 2008; Kang and Reynolds, 2009; Reed and Pellecchia, 2005*). Ces molécules sont développées en vue d'applications en thérapeutique humaine. En se liant dans la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques, la plupart des molécules ont été décrites comme mimant le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques et ont été appelées molécules mimétiques des BH3. Aujourd'hui, au moins 5 d'entre elles sont en essais cliniques (*Kang and Reynolds, 2009*). La partie suivante présente les principales molécules ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

2-3-1/ Les petites molécules inhibitrices de Bcl-2 ou mimétiques des BH3

2-3-1a/ Intérêt des petites molécules organiques

Les molécules organiques présentent de nombreux avantages. En particulier, ces molécules peuvent être facilement optimisées pour accroître leur efficacité. En effet, une fois le squelette de la molécule identifié pour sa capacité à interagir avec les membres anti-

apoptotiques de la famille Bcl-2, il est possible d'adapter ce squelette par des modifications chimiques pour améliorer la solubilité, la perméabilité cellulaire, la stabilité, l'affinité, la spécificité et l'activité du composé.

Les premiers inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont issus de sources naturelles et ont ensuite été modifiés pour optimiser leur activité et réduire leur toxicité. La connaissance des structures tridimensionnelles, en particulier de Bcl-2 et de Bcl-x_L, a servi de base pour la modélisation de cribles virtuels *in silico* de banques de petites molécules. Les molécules ainsi identifiées sont caractérisées par leur profil d'interaction avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Certaines molécules ciblent à la fois Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1 et Mcl-1 et sont dites pan-Bcl-2, comme le gossypol ou l'acide gambogique. D'autres présentent un profil d'interaction plus spécifique, comme l'ABT-737. Au début de ma thèse, des molécules spécifiques de Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, mais pas de Bfl-1 et de Mcl-1, avaient été décrites.

2-3-1b/ Le Gossypol et ses dérivés

Le gossypol ([Figure 28](#)) est un pigment phénolique potentiellement toxique retrouvé dans la graine, la tige et les racines de la plante de coton (*Kang and Reynolds, 2009*). Cette molécule a initialement été identifiée comme contraceptif en Chine dans les années 1950. Puis, elle a été ultérieurement utilisée dans les thérapies anti-tumorales. Alors que le mécanisme d'action du gossypol était mal connu, ce composé a été le premier inhibiteur chimique de Bcl-2 à entrer en essai clinique pour le traitement de gliomes (*Bushunow et al., 1999*). C'est seulement en 2003 qu'un criblage d'une banque de produits naturels de type phénol pour leur capacité à inhiber l'interaction Bad/Bcl-x_L montre que le gossypol peut se lier dans la poche hydrophobe d'un membre anti-apoptotique (Bcl-x_L) (*Kitada et al., 2003*). Le gossypol, également appelé BL-193, est un mélange racémique de deux isoformes : (-)-gossypol et (+)-gossypol. Une étude multidimensionnelle par RMN (résonance magnétique nucléaire) montre que l'isoforme la plus efficace cliniquement (-)-BL-193 se lie dans la poche hydrophobe de Bcl-2 et de Bcl-x_L. Finalement, il a été démontré que le gossypol cible efficacement Bcl-2, mais aussi Bcl-x_L, Bcl-w et Mcl-1 de l'ordre du

submicromolaire, mais pas Bfl-1 (Zhai *et al.*, 2006). Il a également été montré que le gossypol amplifie l'effet du traitement chimiothérapeutique conventionnel de type CHOP (cyclophosphamide-adriamycin-vincristine-prednisolone) dans les DLBCL (Mohammad *et al.*, 2005). Ascenta Therapeutics a développé la forme AT-101 correspondant à l'isoforme (-)-gossypol, qui est actuellement en phase clinique III pour des cancers du cou et du pancréas et sur des gliomes malins (Azmi *et al.*, 2011).

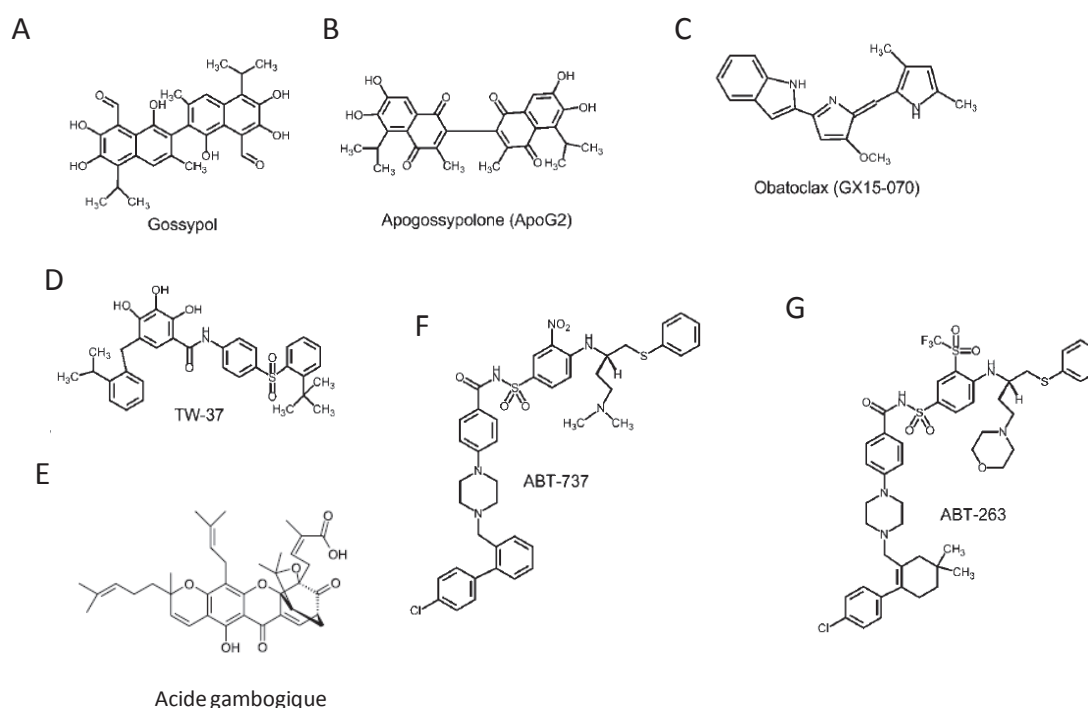


Figure 28 : Structure de quelques molécules mimétiques des BH3

(A) Gossypol. (B) Apogossypolone ou ApoG2. (C) Obatoclax ou GX15-070. (D) TW-37. (E) Acide gambogique. (F) ABT-737 et (G) ABT-263 (d'après (Vogler *et al.*, 2009b; Zhai *et al.*, 2008b)).

Des dérivés du gossypol, l'apogossypol (Apo) (2^{ème} génération) et l'apogossypolone (ApoG2) (3^{ème} génération) sont particulièrement étudiés (Figure 28). Le premier a été développé par l'institut Burnham. Il est plus spécifique de Bcl-2 et Mcl-1 et moins toxique que le gossypol. Cependant, son mécanisme d'action ne semble pas faire intervenir les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (van Delft *et al.*, 2006; Vogler *et al.*, 2009c). La troisième génération a été développée par Ascenta Therapeutics dans l'objectif de réduire la réactivité non spécifique et la toxicité du gossypol. ApoG2 cible efficacement Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1. Cependant, aucune donnée n'est disponible pour Bfl-1. Ces dérivés sont actuellement

en développement pré-clinique pour les cancers du pancréas, les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens (Azmi *et al.*, 2011).

Des études récentes explorent de nombreux dérivés de l'apogossypol (Wei *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010). Ainsi, une nouvelle formule BI-97C1 qui cible également Bfl-1 a été proposée. BI-97C1 inhibe la liaison de peptides BH3 avec Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 et Bfl-1 avec des IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) respectivement de 0,32 , 0,31 , 0,20 et 0,62 μM et représente donc un inhibiteur pan-Bcl-2 (Wei *et al.*, 2010).

2-3-1c/ Obatoclax ou GX15-070

L'obatoclax (GX15-070) (Figure 28), un autre inhibiteur pan-Bcl-2, a été développé par la société Gemin X Biotech. Son efficacité est de l'ordre de la centaine de nanomolaires. L'obatoclax est un dérivé synthétique de prodiginines qui non seulement inhibe l'interaction entre les membres pro- et anti-apoptotiques, mais qui augmente aussi l'expression de Bim. Des études précliniques montrent que l'obatoclax a une activité intéressante utilisé seul. De plus, des effets synergiques sont observés *in vitro* en combinaison avec la cytarabine dans des cellules d'ALL, et avec le bortezomib ou le cisplatine dans des cellules LLC, des myélomes et lymphomes humains dont des cellules de lymphomes réfractaires au rituximab. L'obatoclax est en étude clinique de phase I pour des LLC réfractaires, des tumeurs myéloïdes et des tumeurs solides (Kang and Reynolds, 2009).

Une étude récente montre que cette molécule doit être modifiée chimiquement pour des raisons pharmacologiques. En effet, des traitements sur des souris ont montré que les effets bénéfiques ne sont pas atteints, alors que de plus fortes doses entraînent une toxicité neurologique (Azmi *et al.*, 2011) . D'autres études montrent que l'effet cytotoxique de l'obatoclax implique plusieurs voies apoptotiques, dont la voie mitochondriale (Konopleva *et al.*, 2008), et que la molécule induit l'arrêt du cycle cellulaire indépendamment de l'apoptose.

2-3-1d/ TW-37

La molécule TW-37 (Figure 28) a été découverte par des chercheurs de l'Université du Michigan voulant identifier une molécule ayant une forte affinité aussi bien pour Mcl-1 que pour Bcl-2 et Bcl-x_L (Verhaegen *et al.*, 2006). La molécule a été isolée sur la base de la structure de Bim par des techniques bioinformatiques. TW-37 coopère avec la gemcibatine, un agent chimiothérapeutique conventionnel, pour induire l'apoptose d'une lignée humaine de cancer du pancréas et réduit la taille des tumeurs dans un modèle de xénogreffe d'une lignée humaine du cancer du pancréas dans des souris SCID (Azmi *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes d'action de TW-37 sont encore peu connus. Toutefois, Azmi *et al.* montrent que TW-37 induit l'apoptose via la translocation nucléaire de la protéine pro-apoptotique PAR-4 (prostate apoptosis response-4) dans des cellules de cancer du pancréas et suggère que ce mécanisme est indépendant de Bcl-2 et Bcl-x_L. Cette dernière hypothèse a été confirmée par les travaux de Vogler *et al.* (Vogler *et al.*, 2009c). Cette molécule est actuellement en phase clinique I/II pour les cancers du pancréas et du poumon et les lymphomes non hodgkiniens (Azmi *et al.*, 2011).

2-3-1e/ Acide gambogique

L'acide gambogique (Figure 28) est un produit naturel issu de la résine de *Garcinia hanburyi*, un arbre originaire d'Asie. Ce composé a été identifié dans un crible haut-débit mesurant l'activité des caspases. L'idée initiale était de trouver des molécules capables d'activer les caspases pour induire l'apoptose (Zhang *et al.*, 2004). L'étude des mécanismes d'activation de l'apoptose induite par ce produit a ensuite montré entre autres l'implication des membres de la famille Bcl-2 dans ce processus. En effet, l'acide gambogique inhibe les six membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce qui le définit comme un pan-Bcl-2 (Zhai *et al.*, 2008b). Cependant, l'acide gambogique présente une activité cytotoxique dans des MEF bax^{-/-}bak^{-/-}, ce qui suggère que les membres de la famille Bcl-2 ne sont pas les seules cibles de cette molécule et d'autres études montrent que l'acide gambogique présente un mode d'action varié.

2-3-1f/ l'ABT-737 et son homologue oral l'ABT-263

En 2005, les laboratoires Abbotts conçoivent pour la première fois une molécule anti-Bcl-2 ayant des effets prometteurs de l'ordre du nanomolaire. Une approche nouvelle utilisant la résonance magnétique nucléaire et l'étude structure/fonction (SAR by NMR pour **structure activity relationships by nuclear magnetic resonance**) a été utilisée pour cribler une banque de petites molécules capables de se fixer dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L. Deux molécules se liant à des sites voisins dans la poche hydrophobe avec des affinités modestes ont ainsi été identifiées et ont été liées chimiquement en une seule molécule. Des modifications complémentaires ont permis d'obtenir l'ABT-737 (Figure – 24). L'ABT-737 présente une forte affinité non seulement pour Bcl-x_L, mais aussi pour Bcl-2 et Bcl-w (K_i<1nM) et une très faible affinité pour Mcl-1 et Bfl-1 (K_i>1μM). L'ABT-737 a donc le même profil de spécificité d'interaction aux anti-apoptotiques que Bad (Oltersdorf et al., 2005). En effet, les superpositions des représentations tridimensionnelles du domaine BH3 de Bad ou de Bim et celle de l'ABT-737 dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L montrent que les mêmes résidus sont sollicités (Lee et al., 2007; Oltersdorf et al., 2005). De plus, la structure cristalline de l'ABT-737 dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L montre que la molécule se lie à Bcl-x_L au niveau de deux sites dans la poche hydrophobe (Lee et al., 2007). Contrairement aux autres molécules présentées ici, l'ABT-737 n'active pas l'apoptose des cellules déficientes pour Bax et Bak, démontrant ainsi que la molécule agit uniquement au niveau de la voie mitochondriale (van Delft et al., 2006).

Des expériences *in vitro* ont montré l'effet de l'ABT-737 sur des cellules primaires LLC-B à 10 nM (Oltersdorf et al., 2005). A plus fortes concentrations, l'ABT-737 est capable d'induire l'apoptose de lignées cellulaires de myélomes multiples, de gliomes et de cancers des poumons à petites cellules (SCLC pour **s**mall **c**ell **l**ung **c**arcinoma). D'autres études ont également montré que des cellules primaires de patients atteints de LLC, d'AML, d'ALL et de néoplasmes B, comme les lymphomes de la zone marginale et les lymphomes folliculaires, sont fortement sensibles à l'apoptose induite par l'ABT-737 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. L'ABT-737 augmente *in vitro* la réponse aux radiations ainsi qu'à de multiples agents chimiothérapeutiques (Kang and Reynolds, 2009). Cependant, l'ABT-737 est rapidement métabolisé et a une faible demi-vie *in vivo*, limitant sa disponibilité sous forme

orale. Pour augmenter le potentiel clinique de l'ABT-737, la molécule a été adaptée à la prise orale sous forme de l'ABT-263, en modifiant 3 groupements chimiques (Figure 28) (Tse et al., 2008). L'ABT-263 se lie à Bcl-2 avec une affinité inférieure à 100 picomolaires. L'effet anticancéreux de l'ABT-263 a été démontré dans un modèle de xénogreffe de cancer du poumon à petites cellules et de cellules d'ALL où le traitement entraîne la régression complète de la tumeur. L'ABT-263 (navitoclax) est actuellement en essai clinique de phase I en combinaison avec différents agents chimiothérapeutiques, comme l'erlotinib (Tarceva®) ou le rituximab (Rituxan®), dans le cadre de traitements de carcinomes pulmonaires à petites cellules et sur des hémopathies malignes B. En parallèle, une étude clinique de phase I/II est aussi en cours pour des LLC et d'autres tumeurs malignes lymphoïdes en rechute (Kang and Reynolds, 2009). Enfin, une étude clinique de phase II pour des LLC de première ligne en combinaison avec le rituximab se poursuit.

Une étude reconstituant un environnement sanguin a démontré que l'ABT-263 se lie plus fortement aux protéines du sérum que l'ABT-737. Ce phénomène diminue la sensibilité des cellules LLC à l'ABT-263 et à l'ABT-737 (Vogler et al., 2010). Par conséquent, de nouvelles modifications sont attendues sur l'ABT-263 afin d'augmenter sa disponibilité dans le sang et donc ses propriétés pharmacologiques.

2-3-2/ Phénomène de résistance induit par les molécules mimétiques des BH3

Les molécules mimétiques des BH3 ciblent les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 avec des spécificités et affinités différentes pour chacun d'eux. La surexpression d'un membre anti-apoptotique non ciblé par la molécule mimétique de BH3 peut conduire à des phénomènes de chimiorésistance, puisque l'expression d'au moins un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 permet la survie de la cellule.

Une étude récente a identifié l'expression de gènes de la famille Bcl-2 corrélée à une bonne sensibilité à l'ABT-263 dans un large panel de lignées SCLC et de

leucémies/lymphomes T/B (*Tahir et al., 2010*). Une forte expression de Bcl-2 et Noxa et une faible expression de Mcl-1 sont corrélées à une bonne sensibilité à l'ABT-263. Tandis que l'expression de A1/Bfl-1 et Mcl-1 est significativement plus forte dans les lignées cellulaires résistantes par rapport aux lignées cellulaires sensibles à l'apoptose induite par l'ABT-737. De même, dans des lignées dérivées de patients atteints de cancer du rein, le rôle de Mcl-1 et de Bfl-1 dans la résistance à l'ABT-737 a été mis en évidence par la technique des ARN interférents dirigés contre ces deux protéines anti-apoptotiques (*Zall et al., 2010*). Dans des leucémies/lymphomes de type B, la surexpression de Mcl-1 et de Bfl-1 est responsable de la résistance à l'ABT-737 dans des lignées DLBCL et celle de Bcl-x_L et de Bfl-1 dans les LLC (*Vogler et al., 2009a; Yecies et al., 2010*). D'ailleurs, l'inhibition de l'expression de Mcl-1 par ARN interférence (siARN) ou une drogue réprimant Mcl-1 comme l'ARC, un inhibiteur de transcription, le cycloheximide ou le selicilib, augmente l'effet de l'ABT-737 (*Pandit and Gartel, 2010; van Delft et al., 2006; Zall et al., 2010*). De plus, l'Obatoclax synergise avec l'ABT-737 en inhibant la liaison entre Bak et Mcl-1 diminuant ainsi la résistance à l'ABT-737 due à Mcl-1. De même, la combinaison de l'ABT-737 avec des agents thérapeutiques, comme le flavopiridol (un inhibiteur de kinase dépendante des cyclines), l'arsenic trioxide, ou encore le fenretinide, a montré un effet synergique via l'inactivation de Mcl-1 par le deuxième agent. L'ensemble de ces études démontre la nécessité de combiner des agents BH3 mimétiques aux agents thérapeutiques conventionnels.

En conclusion, le traitement par des mimétiques de BH3, en particulier l'ABT-737, nécessite d'une part, la présence de Bax et Bak fonctionnels. D'autre part, la quantité de membres pro-apoptotiques libérés doit excéder, dans le cas de l'ABT-737, celles de Bfl-1 et de Mcl-1 libres puisque ces deux protéines anti-apoptotiques ne sont pas inhibées par l'ABT-737. Ces données suggèrent que l'inhibition de l'ensemble des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est nécessaire pour un effet thérapeutique optimal. En effet, l'expression d'au moins un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, non ciblé par le traitement thérapeutique, peut contribuer à la survie des cellules cancéreuses.

Par conséquent, une drogue ciblant l'ensemble de la famille Bcl-2 semblerait plus appropriée que plusieurs drogues ciblant une partie des membres. Cependant, un composé pan-Bcl-2 s'avère généralement plus toxique. En revanche, des molécules très spécifiques

peuvent être utilisées à de faibles concentrations et être moins toxiques. La combinaison de ces molécules permet alors de réduire l'ensemble des effets toxiques tout en induisant l'effet thérapeutique souhaité.

Le rôle de Bfl-1 dans les cancers et dans la chimiorésistance a été démontré (chapitre 2-2-2). L'identification de Bfl-1 comme cible thérapeutique dans des hémopathies B et dans la chimiorésistance à l'ABT-737 et à l'ABT-263 montre la nécessité d'identifier des molécules ciblant Bfl-1 avec une forte affinité. En vue d'identifier des petites molécules ciblant Bfl-1, l'équipe de Nathalie Bonnefoy-Bérard avait développé des aptamères peptidiques dirigés contre Bfl-1, un outil permettant l'identification de molécules inhibitrices de Bfl-1.

2-3-3/ Stratégie ciblant Bfl-1 : aptamère peptidique

2-3-3a/ Les aptamères peptidiques

Les aptamères peptidiques ont été conçus à Boston dans l'équipe du Dr Brent (Colas *et al.*, 1996) pour inhiber spécifiquement les fonctions de protéines cibles dans des cellules vivantes. Par analogie avec les immunoglobulines, ces molécules présentent une région peptidique variable dont la structure est contrainte par une plate-forme protéique invariable. La région variable est une séquence d'acides aminés aléatoire. La plate-forme protéique est la thioredoxine bactérienne A, dont le site catalytique est exposé vers l'extérieur. Ce site catalytique est remplacé par une séquence peptidique aléatoire de 20, 13 ou 8 acides aminés, permettant d'inactiver l'activité enzymatique de la thioredoxine bactérienne A et de présenter la région variable vers l'extérieur. L'aptamère peptidique correspond à la thioredoxine bactérienne A contenant la région variable remplaçant le site catalytique (Figure 29). Les deux cystéines flanquant le site actif ont été mutées en sérine pour éviter la formation de ponts disulfures et la reconstitution du site actif.

D'autres plates-formes ont été développées : la GFP (green fluorescent protein), un dérivé inactif de la nucléase de *Staphylococcus*, l'inhibiteur de protéase eglin C, le facteur de transcription SP1... (Buerger and Groner, 2003).

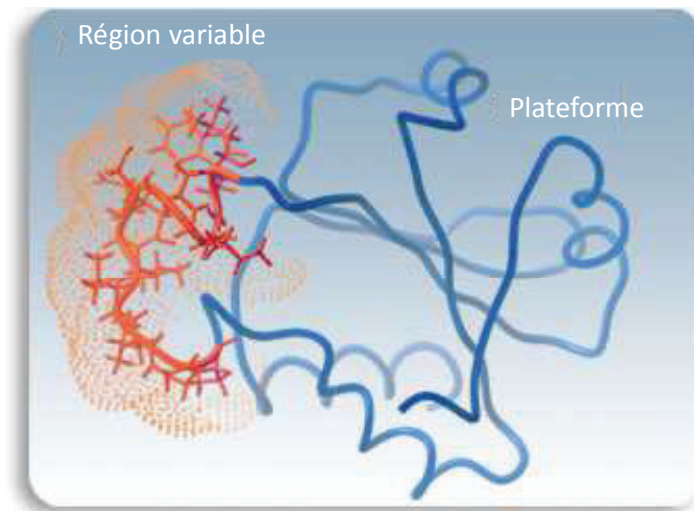


Figure 29 : Structure d'un aptamère peptidique

Structure typique d'un aptamère peptidique composé d'une plateforme protéique fixe (ici la thioredoxine bactérienne A, en bleue) et d'une courte région variable aléatoire (insérée dans le site actif de la thioredoxine bactérienne A, en rouge).

La région variable des aptamères peptidiques est ancrée par ses deux extrémités dans la plate-forme protéique, se démarquant ainsi des autres molécules peptidiques combinatoires non contraintes ou fusionnées à une seule extrémité. Cette double contrainte favorise l'exposition de la région peptidique vers l'extérieur et permet ainsi à des acides aminés hydrophobes d'être à la surface de la molécule. La conformation contrainte du peptide améliore la spécificité et l'affinité pour la cible protéique et peut permettre de discriminer des membres proches d'une même famille protéique (Colas *et al.*, 1996). L'aptamère peptidique permet de protéger le peptide contraint de la protéolyse et offre une meilleure stabilité dans des conditions biologiques. Enfin, la double contrainte facilite la résolution de la structure tridimensionnelle de la région variable, en particulier lorsque la structure de la plate-forme est connue. La structure tridimensionnelle de l'aptamère peptidique peut servir de base pour le développement de petites molécules à visée thérapeutique, comme nous le verrons plus loin, dans la partie résultats.

Au sein du laboratoire du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard, un criblage d'aptamères peptidiques a été réalisé contre Bfl-1 selon le protocole décrit par Bickle et al. (*Bickle et al., 2006*) et a permis la sélection de 67 aptamères peptidiques capables de se lier à Bfl-1 (*Brien et al., 2011*). Des études complémentaires en cellules de mammifère ont permis de sélectionner deux aptamères peptidiques, Apt50 et Apt27, capables de sensibiliser une lignée leucémique B à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques conventionnels (*Brien et al., 2011*). Parmi ces deux aptamères peptidiques, Apt50 est plus spécifique de Bfl-1 par rapport aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1, d'après des essais d'immunoprécipitation dans les HeLa. Ces résultats confirment, par une méthode différente de l'ARN interférence, que Bfl-1 est une cible thérapeutique dans les leucémies/lymphomes de type B et montrent l'intérêt de développer des inhibiteurs spécifiques de Bfl-1.

2-3-3b/ Des outils pour la recherche fondamentale et l'identification de molécules à visée thérapeutique

Les aptamères sont des outils puissants, puisqu'ils permettent de discriminer des protéines d'une même famille (*Colas et al., 1996*), une forme mutée d'un oncogène comme Ras par rapport à la protéine sauvage (*Xu and Luo, 2002*) ou encore deux allèles d'une même protéine (*Xu et al., 1997*). Ils peuvent également être utilisés pour identifier des réseaux d'interaction protéique, des mécanismes fonctionnels d'une protéine ou encore des régions de régulation de l'activation d'une protéine. Par exemple, l'utilisation d'aptamères peptidiques a permis d'identifier des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. Un premier crible a permis la sélection d'aptamères peptidiques capables d'inhiber la prolifération de cellules de rat XC. L'aptamère peptidique alors sélectionné a ensuite servi d'appât pour cribler des banques de cDNA humain par double-hybride chez la levure. La calcineurine dont l'activité anti-proliférative est activée par la liaison à l'aptamère peptidique a ainsi été identifiée. L'aptamère peptidique active notamment l'activité phosphatase de la calcineurine comme le montre la déphosphorylation de Bad (*de Chasse et al., 2007*). Cette étude illustre l'utilité des aptamères peptidiques en vue d'identifier des

réseaux d'interactions protéine-protéine impliquées dans des mécanismes de régulation cellulaire.

Il existe aussi des aptamères peptidiques dirigés contre des protéines virales, comme les oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus humain (*Butz et al., 2000; Nauenburg et al., 2001*), la protéine core du virus de l'Hépatite B (*Butz et al., 2001*), la protéine AL1 du virus de la mosaïque dorée de la tomate (*Lopez-Ochoa et al., 2006*) et la protéine A20 du virus de la vaccine (*Saccucci et al., 2009*).

Une des contraintes des aptamères peptidiques est leur capacité à pénétrer dans les cellules, limitant leur développement dans un but thérapeutique. L'aptamère KDI1 spécifique du récepteur EGF a été produit avec une séquence poly-arginine permettant de traverser la membrane cellulaire. L'ajout de cette protéine de fusion à des cellules tumorales humaines A431 inhibe entre autres la prolifération cellulaire (*Buerger et al., 2003*). Toutefois, l'utilisation d'aptamères peptidiques *in vivo* reste difficile. De plus, ils sont immunogènes et rapidement dégradés par le métabolisme hépatique. Par conséquent, les aptamères peptidiques ou leurs peptides dérivés sont difficilement utilisables à des fins thérapeutiques. Néanmoins, ils peuvent servir de base pour identifier des petites molécules à visée thérapeutique. En effet, l'aptamère peptidique peut servir de guide pour identifier des petites molécules capables de se lier sur la même surface moléculaire que sa cible et d'induire le même effet biologique. Par exemple, un crible de petites molécules capables de rompre l'interaction entre l'aptamère peptidique Apt50 et sa cible Bfl-1 nous a permis d'identifier des molécules ayant une meilleure affinité pour Bfl-1 que pour l'aptamère peptidique lui-même (2^{ème} partie des résultats).

Objectifs de la thèse

L'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard s'intéresse depuis plusieurs années à la protéine anti-apoptotique Bfl-1, un membre de la famille Bcl-2. Comme nous l'avons vu, Bfl-1 est un gène surexprimé dans de nombreux cancers. En particulier, plusieurs travaux ont montré que Bfl-1 représente une cible thérapeutique potentielle au même titre que Bcl-2, Bcl-x_L ou encore Mcl-1, notamment dans les hémopathies malignes. De façon intéressante, la littérature nous a conduits à faire l'hypothèse que Bfl-1 serait impliquée dans l'établissement de cancers T viro-induits.

Des études ont montré que la protéine Tax de HTLV-1 active l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L et le promoteur de *bfl-1*. L'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L est activée par les deux voies NF-κB et AP-1 qui sont elles mêmes régulées, non seulement par Tax, mais aussi par la protéine HBZ de HTLV-1. **Nous nous sommes alors intéressés à la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et/ou HBZ et au rôle de ces protéines anti-apoptotiques dans la survie de ces cellules T infectées par HTLV-1.**

Dans ce contexte, mes objectifs de thèse ont été :

- de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la survie des cellules T infectées par le virus HTLV-1. Nous avons eu pour objectif de déterminer dans un premier temps les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1, et aussi de Bcl-x_L, par les protéines virales Tax et/ou HBZ. Dans un deuxième temps, le rôle de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 a été abordé.

- de proposer une nouvelle stratégie anti-tumorale ciblant Bfl-1. J'ai eu pour objectif d'identifier des petites molécules ciblant Bfl-1 par la technologie Aptascreen® utilisant un aptamère peptidique dirigé contre Bfl-1. Cette technologie a été développée par la société de biotechnologie Imaxio (Lyon). Au laboratoire Inserm, les molécules identifiées ont ensuite été caractérisées dans des tests biochimiques et fonctionnels *in vitro* par deux ingénieurs de

recherche. Sachant qu'il n'existe pas de traitement efficace contre l'ATLL, j'ai exploré l'effet de molécules dirigées contre Bfl-1 caractérisées *in vitro* sur la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Cette partie s'intègre dans un projet de recherche à long terme développé par l'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard.

RÉSULTATS

1^{ERE} PARTIE : ARTICLE ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ du virus HTLV-1 et conséquences sur la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

1/ RESUME DU CONTEXTE ET DES PRINCIPAUX RESULTATS

HTLV-1 est l'agent étiologique entre autres de l'ATLL, une hémopathie T pour laquelle il n'existe pas de traitement efficace. L'ATLL est caractérisée par une prolifération monoclonale de lymphocytes T CD4⁺ activés (*Richardson et al., 1990*). Cette pathologie se développe au cours de plusieurs décennies et les clones malins infectés par HTLV-1 peuvent persister au moins 7 ans chez le même individu (*Etoh et al., 1997*). **Ces données suggèrent la mise en place de mécanismes de survie des cellules T infectées par HTLV-1.** D'ailleurs, des voies de signalisation, dont les voies NF-κB et AP-1, sont constitutivement activées dans les cellules de patients atteints d'ATLL (*Hall and Fujii, 2005; Sun and Yamaoka, 2005*). Ces voies de signalisation sont entre autres impliquées dans la survie cellulaire et pourraient activer l'expression de gènes de survie, tels que les gènes codant pour des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Comme nous l'avons largement décrit dans la partie introductive de ce travail de thèse, l'activation de ces voies peut résulter de l'expression de protéines virales ou de modifications génétiques ou épigénétiques. Dans le cas de l'infection par HTLV-1, les protéines virales Tax et HBZ sont décrites comme impliquées dans le processus leucémogène ou le maintien du phénotype tumoral (*Matsuoka and Jeang, 2011*). Il est bien documenté que Tax participe à la transformation des cellules T au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL (*El Hajj et al., 2010; Grassmann et al., 1992*). En particulier, Tax module l'expression de gènes cellulaires, favorisant la survie et la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 (*Silbermann and Grassmann, 2007*). Tax induit

notamment la transcription des gènes anti-apoptotiques *bfl-1* et *bcl-x_L* de la famille Bcl-2 (*de la Fuente et al., 2003; Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000*). Cependant, alors que l'expression de Tax peut être perdue au cours des stades tardifs du développement de l'ATLL, celle de HBZ reste maintenue (*Satou et al., 2006; Takeda et al., 2004; Usui et al., 2008*). La protéine HBZ, quant-à elle, serait impliquée dans le maintien du phénotype tumoral aux stades tardifs du développement de l'ATLL, notamment en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses (*Matsuoka, 2010*). Bien que HBZ module les voies NF-κB et AP-1, aucune activité anti- ou pro-apoptotique de HBZ n'a clairement été décrite à ce jour. Sachant que l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L est régulée par les deux voies NF-κB et AP-1 (*Cheng et al., 2000; Edelstein et al., 2003; Salameh et al., 2010*) et que ces voies sont régulées par Tax et HBZ, **nous avons émis l'hypothèse que les protéines virales Tax et/ou HBZ réguleraient l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L, favorisant ainsi la survie des cellules T infectées par HTLV-1.**

Lorsque ce travail a été initié, des études avaient montré une forte expression de Bcl-x_L dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et la capacité de Tax à activer l'expression de Bcl-x_L (*Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000; Tsukahara et al., 1999*). Une seule étude avait montré la capacité de Tax à activer le promoteur de *bfl-1* (*de la Fuente et al., 2003*). Cependant, le rôle de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 n'avait jamais été exploré. Ainsi, après avoir déterminé au niveau messager et protéique l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, nous avons abordé le rôle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la survie de ces cellules par la technique d'ARN interférence. Nos résultats confirment que les protéines Bcl-x_L et Bcl-2 sont fortement exprimées dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et **montrent pour la première fois que Bfl-1 est exprimée dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, mais pas dans les lignées leucémiques T non infectées.** Par une stratégie d'ARN interférence, nous avons observée que les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 étudiées sont sensibles à l'apoptose induite par l'extinction de l'expression de Bfl-1, de Bcl-x_L ou de Bfl-1 et de Bcl-x_L. En revanche, aucune de ces lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 n'est sensible à l'apoptose induite par l'extinction de l'expression de Bcl-2. Nos résultats indiquent donc

clairement que **Bfl-1 et/ou Bcl-x_L, mais pas Bcl-2, jouent un rôle dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.** De plus, l'inhibition simultanée de l'expression de Bfl-1 et de l'activité de Bcl-x_L, respectivement par un shARN dirigé contre Bfl-1 ou le traitement avec l'ABT-737, restaure complètement la mort des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, démontrant que **Bfl-1 et Bcl-x_L coopèrent pour induire la survie de ces cellules.**

Comme Bfl-1 et Bcl-x_L sont deux cibles de la voie NF-κB, nous avons traité les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 avec un inhibiteur de la voie NF-κB. Des données de la littérature indiquaient que l'inhibiteur de la voie NF-κB classique Bay11-7082 réprimait l'expression de Bcl-x_L dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 (*Mori et al., 2002*) et celle de Bfl-1 dans des lignées cellulaires B de lymphome d'Hodgkin (*Loughran et al., 2011*). Au sein d'une même étude, nous montrons que l'inhibiteur Bay11-7082 inhibe partiellement l'expression des messagers de *bfl-1* et de *bcl-x_L* dans les cellules MT-4 et C91PL infectées par HTLV-1. Cette inhibition partielle suggère que des voies autres que la voie NF-κB régulent l'expression des deux protéines anti-apoptotiques dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.

Nous avons observé que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées dans la lignée cellulaire C8166-45 infectée par un virus HTLV-1 déficient n'exprimant que les protéines Tax et HBZ. Comme l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L peut être activée par des facteurs NF-κB ou AP-1 dans différents modèles cellulaires, et que Tax et HBZ modulent les voies NF-κB et les facteurs c-Jun et JunD de la voie AP-1, nous avons proposé que ces deux protéines virales puissent être impliquées dans la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans les cellules infectées par HTLV-1.

Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation capables de réguler l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L, dont les voies NF-κB et AP-1. Alors que des études avaient montré que l'expression de Bcl-x_L était activée par Tax via les voies NF-κB et CREB, aucune étude ne s'était centrée sur les mécanismes d'activation de l'expression de Bfl-1 par les protéines virales. Nos travaux indiquent que **Tax induit la transcription du gène codant pour Bfl-1 dans des lignées cellulaires HeLa et Jurkat et des cellules T primaires.** Nous avons exploré la capacité de Tax à activer l'expression de Bfl-1 par ces deux voies NF-κB et AP-1 dans les cellules HeLa et/ou les cellules T Jurkat. L'activation du promoteur de

bfl-1 a été étudiée par essai luciférase. L'expression de *bfl-1* et de *bcl-x_L* au niveau messager a été quantifiée par RT-PCR en temps réel. Nous avons d'abord étudié l'effet direct des facteurs c-Jun et JunD sur la régulation de l'expression de *bfl-1* et de *bcl-x_L*. Nous avons observé que les facteurs de la famille AP-1, c-Jun, en accord avec l'étude de Edelstein *et al.* (Edelstein *et al.*, 2003), et pour la première fois JunD, activent la transcription de *bfl-1*, mais pas JunB, dans les cellules HeLa. En revanche, c-Jun seul n'active pas l'expression de *bcl-x_L*, alors que dans les mêmes conditions c-Jun active l'expression de *bfl-1*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Salameh *et al.* qui montrent qu'un dimère c-Jun/ATF2 est nécessaire à l'activation de l'expression de Bcl-x_L par le facteur de croissance VEGF (Salameh *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que l'homodimère c-Jun n'est pas capable d'activer significativement la transcription de *bcl-x_L* dans les HeLa et nécessite la présence d'autres facteurs de la famille AP-1. Nous avons ensuite analysé la capacité de Tax à coopérer avec c-Jun et JunD pour activer la transcription de *bfl-1* et de *bcl-x_L*. Nos résultats démontrent pour la première fois que **Tax synergise avec les membres c-Jun et JunD pour induire et augmenter l'expression respective de Bfl-1 et de Bcl-x_L**. De plus, nous avons montré dans des cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ que l'inhibition de l'expression de Tax par ARN interférence corrèle avec une diminution partielle de l'expression de *bfl-1* et de *bcl-x_L*, confirmant la capacité de Tax à induire ou à augmenter l'expression de *bfl-1* et de *bcl-x_L*. Cette inhibition de l'expression de Tax conduit à une mort partielle de ces cellules. Ces données suggèrent fortement que **l'activité anti-apoptotique de Tax résulte de sa capacité à induire l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L**.

Si Tax n'est exprimée que dans certains cas de cellules d'ATLL, HBZ est en revanche systématiquement exprimée (Satou *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2004). Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que HBZ pourrait aussi moduler l'expression de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L. Nous avons ainsi exploré la capacité de HBZ à activer l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L seule ou en coopération avec c-Jun ou JunD dans les cellules HeLa. Ces expériences ont été réalisées selon les mêmes essais expérimentaux réalisés avec Tax. Dans un modèle de surexpression, nous avons ainsi observé que l'homodimère de HBZ n'active ni l'expression de Bfl-1, ni celle de Bcl-x_L. **En revanche, HBZ réprime d'une part la capacité de c-Jun à activer l'expression de *bfl-1*, et favorise d'autre part celle de JunD à activer l'expression de *bfl-1***. De plus, la capacité de HBZ à moduler l'expression de *bfl-1* induite par c-Jun ou JunD nécessite les domaines d'activation (AD) et bZIP de la protéine virale. Nos résultats montrent

également que **HBZ réprime la *trans*-activation du gène codant pour Bfl-1 induite par Tax ou par Tax plus c-Jun. En revanche, HBZ favorise celle induite par Tax et JunD.** Ces résultats ont été confirmés dans les cellules T CD4⁺ Jurkat. Contrairement au gène codant pour Bfl-1, **le gène codant pour Bcl-x_L n'est pas régulé par HBZ** quel que soit son partenaire c-Jun ou JunD. L'ensemble de ces données indiquent que *bfl-1* est plus finement régulée par les protéines virales Tax et HBZ que *bcl-x_L*.

En conclusion, Tax semble jouer un rôle plus important que HBZ dans l'activation de l'expression des protéines de survie Bfl-1 et Bcl-x_L via les facteurs NF-κB, c-Jun et JunD. **Ces données suggèrent que Bfl-1 et Bcl-x_L sont principalement exprimées au cours du développement de l'ATLL quand Tax est exprimée.** De plus, Bfl-1 et/ou Bcl-x_L jouent un rôle dans la survie de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. **Par conséquent, Bfl-1 et Bcl-x_L représenteraient des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter les patients atteints d'ATLL.**

Nous avons centré notre article sur l'étude de la régulation de l'expression de Bfl-1 par les protéines virales Tax et HBZ et sur le rôle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L et Bfl-1) dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Les résultats obtenus concernant la régulation de l'expression de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ sont présentés dans la partie résultats complémentaires. Cette seconde partie présente également la coopération entre Bfl-1 et Bcl-x_L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.

2/ ARTICLE : TAX-INDUCED EXPRESSION OF THE ANTI-APOPTOTIC BFL-1 PROTEIN CONTRIBUTES TO SURVIVAL OF HTLV-1-INFECTED T-CELLS

Tax-induced expression of the antiapoptotic Bfl-1 protein contributes to survival of HTLV-1-infected T-cells

Héloïse Macaire^{1,2,3}, Aurélien Riquet^{1,2,3}, Marie-Claude Biémont-Trescol^{1,2,3}, Madeleine Duc Dodon^{1,3,4}, Olivier Hermine⁵, Anne-Laure Debaud^{1,2,3}, Renaud Mahieux^{1,3,4}, Jean-Michel Mesnard⁶, Marlène Pierre^{1,2,3}, Louis Gazzolo^{1,3,4}, Nathalie Bonnefoy-Bérard^{1,2,3}, and Hélène Valentin^{1,2,3*}

From the ¹Université de Lyon, France; ²INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France; ³Université Lyon 1, UMS3444/US8, France; ⁴INSERM, U758, ENS-Lyon, 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69007, France; ⁵CNRS, UMR8603, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, Paris, F-75015, France; ⁶CPBS/CNRS/UMR5236, 1919 Route de Mende, Montpellier, F-34060, France;

* To whom correspondence may be addressed. U851 Inserm, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France; **Tel.:** (+33) 4 37 28 23 51; **Fax:** (+33) 4 37 28 23 41; **E-Mail:** helene.valentin@inserm.fr

Running title:

Tax of HTLV-1 mediates T-cell survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) that develops after several decades and for which there is no effective treatment. Among the viral proteins of HTLV-1, Tax and HBZ play a major role in the development of ATLL. In particular, Tax plays an important role in T-cell survival by activating the transcription of cellular genes through NF- κ B and AP-1 transcription factors. Here, we demonstrated that the antiapoptotic Bfl-1 protein of the Bcl-2 family is expressed in HTLV-1-infected T-cell lines, but not in uninfected T-cell lines, while Bcl-2 and Bcl-x_L proteins are expressed in both cell types. We then found that *bfl-1* is expressed in both human T-cell lines and primary peripheral blood lymphocytes after ectopic or stable expression of Tax or knockdown of Tax. Tax stimulates endogenous *bfl-1* transcription through the NF- κ B pathway, using Tax mutants or dominant-negative I κ B α mutant. We then showed that JunD or c-Jun, but not JunB, transcription factors of AP-1 family cooperate with Tax to stimulate *bfl-1* promoter activity and to amplify endogenous *bfl-1* transcription. HBZ, known to modulate AP-1 activity, exerts a repressive effect on Tax-mediated amplification of the *bfl-1* promoter activation by c-Jun and synergizes with Tax and JunD to stimulate *bfl-1* promoter activation. Finally, HTLV-1-infected T-cell lines are differentially sensitive to silencing of Bfl-1, Bcl-x_L and Bcl-2 by short hairpin RNA strategy. Indeed, while no cell death was observed after Bcl-2 knockdown, either Bfl-1 or Bcl-x_L knockdown decreased survival of HTLV-1-infected T-cell lines. These results directly implicate Bfl-1, in addition to Bcl-x_L, in the survival of HTLV-1-infected T-cells and furthermore suggest that both Bfl-1 and Bcl-x_L represent therapeutic targets for ATLL treatment.

INTRODUCTION

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is associated to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection and is an aggressive malignancy of mature activated CD4⁺ T-cells, and in rare cases of CD4⁺CD8⁺ or CD8⁺ T-cells. Among the 10-20 million people infected

worldwide, 2-10% will develop an ATLL after a long period of clinical latency. ATLL is characterized by the persistence and clonal expansion of CD4⁺ infected T-cells (Cavrois et al., 1996; Etoh et al., 1997), but the molecular mechanisms of ATLL development are complex and remain to be better defined. Among them, some are related to the expression of regulatory viral Tax protein and HTLV-1 basic leucine zipper (bZIP) factor (HBZ) (Li and Green, 2007). If the oncoprotein Tax is highly expressed in early stages of ATLL development, its expression decreased and become almost undetectable in most ATLL cells (Franchini et al., 1984; Furukawa et al., 1995; Sugamura et al., 1984). Strong evidences indicate that Tax plays a central role in T-cell transformation both *in vitro* in human cells and *in vivo* in transgenic animal models, even if Tax-induced immortalization of human primary T-cells is a very rare event (Bellon et al., 2010; Grassmann et al., 1992; Grossman et al., 1995; Hasegawa et al., 2006; Nerenberg et al., 1987; Pozzatti et al., 1990; Robek and Ratner, 1999). Tax modulates cellular gene expression and interferes with the control of cell survival, proliferation and genetic stability of infected cells (Grassmann et al., 2005; Ishikawa et al., 2010; Journo et al., 2009). Tax does not directly bind to DNA, but promotes the recruitment of transcription factors on targeted cellular genes. In particular, Tax activates survival transcription factors, such as nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) members. Then, activated transcription factors directly increase expression of antiapoptotic proteins, such as c-Flip, Hiap-1, Bcl-x_L or IAP (Chlichlia and Khazaie, 2010; Grassmann et al., 2005; Hall and Fujii, 2005; Silbermann and Grassmann, 2007; Taylor and Nicot, 2008; Zane et al., 2010). As a consequence, both HTLV-1- and Tax-transformed T-cells show higher resistance to apoptosis than control cells (Fujita and Shiku, 1995; Taylor and Nicot, 2008).

While Tax is repressed to be undetectable in some ATLL cases, HBZ remains expressed in all stages of ATLL process (Ishikawa et al., 2010; Journo et al., 2009; Nagakubo et al., 2007; Nakayama et al., 2008; Satou et al., 2006; Takeda et al., 2004; Usui et al., 2008). Both spliced and unspliced HBZ (sHBZ and usHBZ) transcripts are detected in patient cells, even if sHBZ transcripts and proteins are more abundant than that of usHBZ (Satou et al., 2006; Usui et al., 2008; Yoshida et al., 2008). HBZ controls gene

transcription by interacting with Jun members of the AP-1 family through their bZIP domain. HBZ isoforms interact with Jun members and modulate their activity (Matsuoka, 2010). To date, an increasing number of reports indicates that HBZ promotes T-cell proliferation and inflammation (Arnold et al., 2008; Hagiya et al., 2011; Kuhlmann et al., 2007; Matsuoka, 2010; Satou et al., 2006; Satou et al., 2011).

Many viruses responsible for the development of leukemia/lymphoma have evolved in order to escape the immune surveillance. Indeed, they can inhibit apoptosis by encoding viral Bcl-2 analogs, which mimic cellular antiapoptotic Bcl-2 family proteins, or by up-regulating the cellular antiapoptotic Bcl-2 family protein expression (Polster et al., 2004; Postigo and Ferrer, 2009; White, 2006). Impaired apoptosis associated with an imbalance of the Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) family members expression in favor of antiapoptotic proteins is a hallmark of human hematopoietic malignancies and is frequently responsible for resistance to therapy (Kirkin, 2004 #15; (Adams and Cory, 2007). The NF- κ B transcription factors have been shown to directly up-regulate both *bfl-1* (Bcl-2 fetal liver) and *bcl-x_L* (Bcl-2 like long) gene expression. Over-expression of both proteins has been associated with an increased resistance of tumor cells to apoptotic stimuli or to chemotherapeutic drugs (Brien et al., 2007; Chen et al., 2000; Grumont et al., 1999; Lam et al., 2005; Lee et al., 1999; Olsson et al., 2007; Schneider et al., 1997; Simonian et al., 1997; Wang et al., 1999; Zong et al., 1999). Interestingly, several data point out a potential role for NF- κ B-mediated over-expression of *bfl-1* and *bcl-x_L* by viral proteins in B- and T-lymphoma/leukemia. Indeed, the *bfl-1* promoter is triggered by Epstein-barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1), by EBV nuclear antigen 2 (EBNA2) and by HTLV-1 Tax proteins (D'Souza et al., 2000; D'Souza et al., 2004; de la Fuente et al., 2003). Similarly, *bcl-x_L* gene is activated by the EBV LMP2A and HTLV-1 Tax proteins in B- and T-cells, respectively (Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000; Portis and Longnecker, 2004). While *bfl-1* and *bcl-x_L* promoters have been described to be activated by Tax, the involvement of these antiapoptotic proteins in HTLV-1-infected T-cell survival remains to be demonstrated.

These considerations prompted us to determine the mechanisms of antiapoptotic *bfl-1* gene regulation by the two critical regulatory viral

Tax and HBZ proteins, differentially expressed during ATLL development. We also aimed to compare the role of the antiapoptotic protein of the Bcl-2 family in survival of HTLV-1-infected T-cells. We report here that Bfl-1 expression is restricted to HTLV-1 status in T-cell lines. We demonstrated that Tax induces Bfl-1 expression through the NF- κ B pathway, but also synergizes with JunD or c-Jun of AP-1 family to activate *bfl-1* transcription. Interestingly, HBZ modulates the synergistic effect between Tax and Jun members on *bfl-1* gene activation. Finally, we showed that knockdown of Bfl-1 or Bcl-x_L, but not Bcl-2, impairs HTLV-1-infected T-cell survival. Altogether, our data strongly suggest that Bfl-1 and Bcl-x_L represent potential therapeutic target for ATLL treatment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and plasmids—The monoclonal antibodies (mAbs) used were either mouse anti-Bcl-x_L (2H12) (Pharmingen), or anti-Bcl-2 (124, Dako SA), or anti-Mcl-1 (SC-12756, Tebu-bio), or anti-c-Jun (OP55, Merck), or anti-Flag (F3165), or anti-cMyc (santa cruz sc-40), or anti- β -actin (Sigma Aldrich). We also used rabbit polyclonal antibodies anti-GST-Bfl-1 (kindly provided by J. Borst, The Netherlands Cancer Institute) and anti-I κ B α (44D4, Cell signaling). The mouse mAb anti-Tax hybridoma (168A51-42) was a kind gift of AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH). Secondary reagents used were ECL anti-rabbit IgG horseradish peroxidase from donkey and anti-mouse IgG horseradish peroxidase from sheep (GE Healthcare).

Plasmids used were empty-pSG5M, pSG5M-Tax-WT, pSG5M-Tax-M22 and pSG5M-Tax-M47 (Meertens et al., 2004a; Smith and Greene, 1990); empty-pJFE and pJFE-Tax-WT (kindly provided by F. Bex, Belgium, (Lamsoul et al., 2005)); empty-pcDNA3, pcDNA-JunB, pcDNA-c-Jun and pCMV-JunD-Flag (Basbous et al., 2003; Thebault et al., 2004); -1374/+81-bfl-1 promoter-driven luciferase gene (Bfl-1-Luc, kindly provided by D. Walls, Dublin, Ireland, (D'Souza et al., 2004)); pRL-TK-renilla luciferase (pRL-TK-Ruc, Promega), pCMV4-HA-I κ B α (S32/36A, (Sun et al., 1996)), and NF- κ B and 5'LTR-HTLV-1-driven luciferase gene (NF- κ B-Luc and LTR-HTLV-1-Luc (Meertens et al.,

2004b)). pcDNA-HBZ-Myc encoding sHBZ and the mutated sHBZ forms deleted for activation (HBZ Δ AD) and for bZIP (HBZ Δ bZIP) domains were previously described (Hivin et al., 2005; Thebault et al., 2004).

Cells-HeLa cell line was grown in DMEM (Gibco Life Technologies) supplemented with 10% endotoxin free FCS (Lonza), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES and 40 μ g/mL of gentamicin (Gibco). The HTLV-1-transformed MT-2, MT-4, C8166-45, SP and FC36.22 T-cell lines were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. The HTLV-1-infected T-cell lines C91PL and HuT-102 were provided by E. Wattel (Lyon, France) and R. Mahieux, respectively. Uninfected human leukemia Jurkat (Clone E6-1), Sup-T1, Molt-4 (Clone 8) and CEM, and lymphoma HuT-78 T-cell lines, served as negative controls, were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. JPX-9 cells are derivatives of Jurkat, which have a stably integrated *tax* gene under the control of a metallothionein promoter and are kindly provided by M. Nakamura (Tohoku University, Japan, (Nagata et al., 1989)). To induce Tax expression, JPX-9 cells were cultured in the presence of 20 μ M CdCl₂. Stably Tax/HBZ-expressing Jurkat (clone E12) T-cells were obtained as previously reported (Lemasson et al., 1997). The T-cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies) supplemented as for DMEM medium. FC36.22 and SP cells were cultured in the presence of 4% of homemade murine IL-2.

Human primary PBMC, obtained from Etablissement de Transfusion Sanguine (Lyon, France), were stimulated with mAbs anti-CD3/CD28 (Dynabeads Human T-cell activator, Invitrogen) 48h prior to transduction. Then, the Tax-expressing T-cells were obtained by transduction of stimulated-PBMC with a lentivirus vector encoding a HTLV-1 Tax enhanced yellow fluorescent protein (YFP) fusion, as previously described (Chung et al., 2003). The obtained CD25⁺CD4⁺ Tax-T-cells were grown in complete RPMI medium supplemented with 1% (v/v) NEM NEAA, 1 mM Sodium Pyruvate and 200 U/ml human IL-2 (Peprotech).

RNA extraction and real-time RT-PCR-0.5-2 x 10⁶ T-cell lines were lysed using TRIzol reagent (Invitrogen) and cDNAs were obtained as previously described (Cottalorda et al., 2006). The

PCR were performed with fastStart SYBER Green Master (Roche) on a StepOne plus machine (Applied Biosystems) using 4 μ M of each primer (Table S1). cDNA levels were normalized using the housekeeping HPRT and GusB genes. 0.1-0.5 x 10⁶ transfected-HeLa cells were lysed according to the manufacturer's specifications (SV total RNA isolation kit, Promega).

Immunoblotting analysis-2-5 x 10⁶ cells were lysed in 50 μ L of NP-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, and 1% NP-40) supplemented with protease inhibitor mixture (Roche). Cytoplasmic protein extracts (70-100 μ g) were separated on a NuPage 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen). Protein expression was analyzed by immunoblotting using specific Abs. Protein-Ab complexes were visualized by chemoluminescence (Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus; PerkinElmer).

Transfections and luciferase assays-2.5x10⁵ or 1.25x10⁵ HeLa cells were plated on 6- or 24-well plates overnight, respectively. Then, cells were transiently transfected with 3 μ g/6-well or 1 μ g/24-well plasmids using JetPEI according to the manufacturer's protocol (Ozyme). 48h post-transfection, cells were collected for RNA and protein extractions or for luciferase assays. To compare amounts of expressing vectors between experiments performed in 6-wells and 24-wells, amounts are presented in figures as ng or μ g of interest plasmid per μ g of total transfected vectors. 4x10⁶ Jurkat cells were plated on 6-well plates in 2 ml of medium and were transiently transfected with 12 μ g/6-well plasmids using nucleofection (program X-001 of the Nucleofector II machin and cell line nucleofector kit V (VCA-1003); Amaxa).

Luciferase activities were determined in triplicate using a Luciferase Assay kit system (Dual-Glo[®], Promega) and a luminometer (Infinite M200, Tecan) according to the manufacturer's specifications. Luciferase activity was calculated using the ratio Luc/Ruc. Normalized luminescence values are presented as relative fold *trans*-activation by comparison to the basal *bfl-1* luciferase activity obtained using empty-vector, which was arbitrary set up to one.

Transduction assays-The RNA interference sequences are summarized in Table S2. The corresponding oligonucleotides were cloned into the lentiviral vector pLL3.7 co-expressing GFP as previously described (Brien et al., 2007). 3×10^5 cells were cultured in a 6-well plate for 24H. Then, cells were transduced with lentiviral vector expressing specific shRNA at 16 MOI in the presence of polybren (Sigma), as previously performed (Brien et al., 2007). Cells were collected at day 3 to 10 to evaluate efficiency of transduction (GFP⁺) by flow cytometry, protein extinction by immunoblotting, and mortality by flow cytometry after staining by 0.5 μ g/mL propidium iodide (PI⁺).

RESULTS

The antiapoptotic Bfl-1 protein is over-expressed in HTLV-1-infected T-cell lines-One study previously reported an activation of the *bfl-1* promoter in a Tax-transfected T-cell line (de la Fuente et al., 2003). To get a more general view of the expression of the antiapoptotic Bfl-1 member of the Bcl-2 family, we analyzed mRNA and protein expression of Bfl-1 in HTLV-1-infected and uninfected T-cells harboring different phenotypes. HTLV-1-transformed T-cell lines were CD4⁺CD8⁺ (SP), CD4⁺ (C91PL, MT-4, C8166-45, MT-2 and HuT-102) and CD8⁺ (FC36.22) (Table S3). We also analyzed uninfected T-cells, such as CD4⁺CD8⁺ (Molt-4 and Sup-T1) and CD4⁺ (CEM, Jurkat and HuT-78) T-cell lines as controls. Interestingly, Bfl-1 transcripts and proteins were detected in all HTLV-1-infected T-cell lines whatever their phenotype, but not in uninfected T-cell lines (Fig. 1A-B). We also compared the expression of Bcl-x_L and Bcl-2. In agreement with previous reports (Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000), we observed that Bcl-2 and Bcl-x_L messengers and proteins were expressed at different levels in both uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines (Fig. S1A-B). In all cases, HTLV-1 infection of T-cells was confirmed by viral Tax expression (Fig. 1A-B).

Thus, these data show for the first time that Bfl-1 expression is restricted to the presence of HTLV-1 in CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell lines, whereas Bcl-2 and Bcl-x_L are not.

Tax activates the transcription of the *bfl-1* gene via the NF- κ B pathway-To determine the molecular mechanism of Bfl-1 induction by HTLV-1, we first focused on Tax protein, which is well known to be involved in T-cell survival. We used JPX-9 cells, a Jurkat sub-line that carries the *tax* gene under the control of the inducible metallothionein promoter. Treatment of JPX-9 cells with CdCl₂ induced *tax* mRNA levels within 12H and *tax* expression persisted until 48H (Fig. 2A). We observed that *bfl-1* transcript levels were significantly induced only 24H post-treatment with CdCl₂ and further increased at 48H. These results indicated that *tax* expression preceded that of *bfl-1* and that the level of *bfl-1* correlated with that of *tax*. *bfl-1* expression was also confirmed in mature Tax-expressing CD4⁺ T-cells derived from transduced-PBMC, whereas Tax-negative control did not express *bfl-1* (Fig. 2B). Thus, these data indicate that Tax strongly induces *bfl-1* gene expression in T-cells.

As Tax *trans*-activates the expression of numerous genes via the NF- κ B pathway (Hall and Fujii, 2005), and as *bfl-1* promoter contains NF- κ B binding sites (D'Souza et al., 2004; Edelman et al., 2003; Zong et al., 1999), we then investigated the role of the NF- κ B pathway in Tax-mediated *bfl-1* transcription (Fig. 3). HeLa cells were transfected with expressing vectors encoding for either wild type Tax (Tax-WT), Tax-M47 (Δ CREB/ATF) or Tax-M22 (Δ NF- κ B) mutants. Then, endogenous *tax* and *bfl-1* mRNA levels were measured by real-time RT-PCR (Fig. 3A). While the level of Tax-WT and Tax mutant transcripts were quite similar (Fig. 3A, left panel), only Tax-WT and Tax-M47 mutant efficiently induced endogenous *bfl-1* mRNA expression (Fig. 3A, right panel). In contrast, Tax-M22 mutant induced only weak *bfl-1* mRNA expression.

To further confirm the involvement of the NF- κ B pathway in Tax-mediated *bfl-1* transcription, we used the dominant-negative I κ B α S32/S36A (I κ B α DN) mutant construct that prevents the phosphorylation and thus the degradation of I κ B α , an inhibitor of the canonical pathway. HeLa cells were co-transfected with either empty- or Tax-expressing vectors and with *bfl-1*-luciferase promoter plasmid (Bfl-1-Luc) and with increasing amounts of I κ B α DN expression vectors. As shown in figure 3B, over-expression of I κ B α DN resulted in a dose-dependent reduction of the Tax-mediated *bfl-1* promoter activation (Fig. 3B, upper panel). Expression of

I κ B α and Tax proteins were checked by immunoblotting (Fig. 3B, lower panels). While I κ B α DN was unable to totally inhibit the Tax-mediated *bfl-1* promoter activation even over than 100 ng (Fig. 3B, upper panel and data not shown), I κ B α DN completely inhibited Tax-mediated NF- κ B-responsive promoter (Fig. S2, left panel). By contrast, I κ B α DN had no effect on HTLV-1-LTR *trans*-activation by Tax (Fig. S2, right panel), showing that this inhibitor is specific to the NF- κ B pathway. We finally analyzed the effect of I κ B α DN on endogenous Tax-mediated *bfl-1* messenger expression. HeLa cells were co-transfected with Tax-WT- and I κ B α DN-expressing vectors and endogenous *bfl-1* transcripts were measured by real-time RT-PCR. Over-expression of I κ B α DN resulted in a 70% inhibition of the Tax-mediated endogenous *bfl-1* mRNA expression (Fig. 3C).

Altogether, these findings not only demonstrate that Tax *trans*-activates the *bfl-1* gene through the NF- κ B pathway, but also suggest that other transcription factors than NF- κ B might be involved in the regulation of *bfl-1* gene expression. Reinforcing such hypothesis, we observed that NF- κ B inhibitor Bay11-7082 partly inhibited *bfl-1* mRNA expression in HTLV-1-infected C91PL and MT-4 T-cell lines (data not shown).

JunD and c-Jun cooperate with Tax to activate bfl-1 gene transcription-Previous reports showed that Tax-M22 mutant deleted for binding to NF- κ B was also unable to activate AP-1-responsive promoter (Peloponese and Jeang, 2006) and that *bfl-1* promoter contains AP-1 binding sites (D'Souza et al., 2004; Edelstein et al., 2003). We therefore wondered whether AP-1 may also be involved in *trans*-activation of the *bfl-1* promoter by Tax. We first investigated the role of AP-1 members on the activation of *bfl-1* gene expression by performing luciferase reporter assays. Co-transfection of HeLa cells with either JunB, c-Jun or JunD and *bfl-1*-luciferase promoter expressing vectors showed that both c-Jun and JunD activated the *bfl-1* promoter in a dose-dependent manner, whereas JunB did not (Fig. S3). We next analyzed the potential cooperation between either Tax and c-Jun or Tax and JunD using suboptimal amounts of AP-1-expressing vectors. Interestingly, over-expression of Tax with c-Jun or JunD resulted in the amplification of the *bfl-1* promoter activity compared to Tax, c-Jun or

JunD alone in a dose-dependent manner (Fig. 4A and B, upper panels). Immunoblotting experiments confirmed the expression of Tax, c-Jun or JunD in transfected-HeLa cells (Fig. 4A and B, lower panels). We next examined the cooperation of Tax with either c-Jun or JunD on endogenous *bfl-1* gene expression. For that purpose, HeLa cells were co-transfected either with Tax and c-Jun- or Tax- and JunD-expressing vectors and *bfl-1* mRNA expression was evaluated by real-time RT-PCR. We observed that *bfl-1* gene transcription was highly increased in cells co-expressing Tax plus c-Jun or Tax plus JunD as compared with cells expressing only Tax or c-Jun or JunD (Fig. 4C).

Thus, these results show for the first time that Tax acts synergistically either with c-Jun or JunD to *trans*-activate the *bfl-1* gene.

HBZ regulates Jun-induced bfl-1 promoter activation via both activation and basic leucine zipper domains-As HBZ modulates gene expression via c-Jun and JunD (Basbous et al., 2003; Kuhlmann et al., 2007; Matsumoto et al., 2005; Thebault et al., 2004), we then focused on the ability of HBZ viral protein to regulate *bfl-1* gene activation. We first analyzed the role of HBZ on the activation of *bfl-1* gene expression by performing luciferase reporter assays. Co-transfection of HeLa cells with HBZ-expressing vector and *bfl-1*-luciferase promoter plasmid showed that HBZ was unable to activate the *bfl-1* promoter, whatever the amount of HBZ expression vector used (Fig. 5A and B, upper panels). We next analyzed the potential effect of HBZ on c-Jun or JunD-mediated *bfl-1* promoter activation using high amounts of Jun-expressing vectors. Interestingly, over-expression of HBZ inhibited c-Jun-mediated activation of the *bfl-1* promoter in a dose-dependent manner (Fig. 5A, upper panel). By contrast, over-expression of HBZ with JunD resulted in the amplification of JunD-mediated *bfl-1* promoter activation in a dose-dependent manner (Fig. 5B, upper panel). Immunoblotting experiments confirmed the expression of HBZ, c-Jun or JunD in transfected-HeLa cells (Fig. 5A and B, lower panels).

We further examined the role of activation (AD) and basic leucine zipper (bZIP) domains in HBZ modulating Jun-induced *bfl-1* promoter activation, using the well characterized HBZ mutants (HBZ- Δ AD and Δ bZIP). The HBZ-WT or each of its deleted forms expressing vector and

the *bfl-1*-promoter vector were transiently co-transfected into HeLa cells with or without c-Jun- or JunD-expressing vectors. As shown in figure 5C, HBZ Δ AD partially repressed c-Jun-mediated *bfl-1* promoter activation, whereas HBZ Δ bZIP was unable to do so (Fig. 5C, *left panel*). By contrast, HBZ Δ AD was unable to enhance JunD-mediated *bfl-1* promoter activation, whereas HBZ Δ bZIP had no significant effect on JunD-mediated *bfl-1* promoter *trans*-activation (Fig. 5C, *right panel*).

Altogether these results demonstrate that (i) HBZ suppresses c-Jun-mediated *bfl-1* promoter activation (ii) HBZ acts synergistically with JunD to increase the activation of the *bfl-1* promoter, and (iii) both the activation and basic leucine zipper domains of HBZ are required to modulate c-Jun- or JunD-induced *bfl-1* promoter activation.

HBZ modulates Tax-cooperation with c-Jun or JunD to trans-activate the bfl-1 promoter-We have shown that Tax acts synergistically with Jun members to enhance the activation of the *bfl-1* promoter and that HBZ modulates Jun-mediated *bfl-1* promoter activity. We then tested whether HBZ modulated the synergic effect between Tax and Jun members on the activation of the *bfl-1* promoter. HeLa cells were co-transfected with *bfl-1*-luciferase promoter vector and either Tax and/or HBZ or Tax and/or HBZ plus c-Jun or Tax and/or HBZ plus JunD expressing vectors. Figure 6A showed that over-expression of HBZ repressed Tax-mediated *bfl-1* promoter activation. Similarly, co-expression of Tax, HBZ and c-Jun led to a total suppression of the *bfl-1* promoter activation, compared to co-expression of Tax plus c-Jun (Fig. 6A, *left panel*). By contrast, over-expression of Tax, HBZ and JunD resulted in an increased of *bfl-1* promoter activity, compared to Tax plus JunD (Fig. 6A, *right panel*). To confirm these results in T-cells, the Jurkat T-cell line was nucleofected with *bfl-1*-promoter vector and empty-, Tax-, HBZ-, c-Jun- or JunD-expressing vectors. As expected, similar results were obtained in Jurkat T-cells (Fig. 6B). Finally, we measured the resulting activity of Tax and HBZ on the endogenous expression of *bfl-1* transcripts by real-time RT-PCR in Jurkat T-cells stably expressing Tax and HBZ (Jurkat-Tax/HBZ). Thus, Jurkat T-cells stably expressing high level of *tax* and low level of *hbz* transcripts also expressed *bfl-1* transcripts (Fig. 6C).

Altogether, these findings demonstrate for the first time that (i) over-expression of HBZ exerted a repressive effect on Tax-mediated amplification of the *bfl-1* promoter activation by c-Jun and (ii) over-expression of HBZ and Tax synergize to stimulate JunD-mediated *bfl-1* promoter activation. However, *bfl-1* remains highly expressed in T-cells when Tax is strongly expressed compared to HBZ.

Bfl-1, as well as Bcl-x_L, is involved in HTLV-1-infected T-cell survival-We finally asked whether Bfl-1 participates to survival of HTLV-1-infected T-cell lines. We also compared the involvement of Bfl-1 to that of two others anti-apoptotic Bcl-2 or Bcl-x_L proteins on the survival of T-cells. We therefore knocked down the expression of these proteins using a lentivirus-based vector pLL3.7 that co-expressed specific shRNA and GFP as a reporter gene, thus permitting transduced cells to be tracked by flow cytometry. The transduction of uninfected (Jurkat) and HTLV-1-infected (C91PL and MT-4) T-cell lines ranged between 87% to 98% after 5 to 7 days of infection (data not shown). Bcl-2, Bcl-x_L or Bfl-1 silencing by the specific shRNA was confirmed by immunoblotting (Fig. 7A). We then assessed the effect of Bcl-2, Bcl-x_L and Bfl-1 knockdown on T-cell survival. We observed that Bcl-x_L and Bfl-1 knockdown potently induced death of HTLV-1-infected C91PL T-cells (Figure 7B, *middle panel*). However, only 20-40% of cell death was detected in C91PL cells transduced by Bcl-x_L or Bfl-1 shRNA, suggesting that Bfl-1 expression may offset the Bcl-x_L knockdown and conversely. Interestingly, Bfl-1 silencing induced 80% of HTLV-1-infected MT-4 T-cell death, whereas MT-4 cell death never exceeded 25% following knockdown of Bcl-x_L within 7 days (Fig. 7B, *right panel*). Finally, Ctl or Bcl-2 shRNA did not induce significant death in transduced C91PL and MT-4 T-cells and viability of uninfected Jurkat T-cells was not altered by all shRNA tested (Fig. 7B).

Altogether, these data directly involve Bfl-1, but also Bcl-x_L, in survival of HTLV-1-transformed T-cell lines.

DISCUSSION

ATLL development is a multistep oncogenic process, including among others survival and proliferative T-cell mechanisms. More and more studies point out the growing complexity of the mechanisms regulating Tax and HBZ expression and their impact in leukemogenesis (see reviews (Chlichlia and Khazaie, 2010; Journo et al., 2009; Matsuoka, 2010)). Understanding the impact of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family on HTLV-1-infected T-cell survival may provide clues for the development of new therapeutic strategies. In the present paper, we show that (i) HTLV-1-infected T-cells express Bfl-1 protein, whereas uninfected leukemia/lymphoma T-cells do not, (ii) the regulatory viral Tax protein induces Bfl-1 expression via NF- κ B and AP-1 pathways, while HBZ protein modulates its expression, and (iii) Bfl-1 is involved in survival of HTLV-1-infected T-cell lines. Thus, these results show for the time that Bfl-1 may represent a potential target for future drug development against ATLL associated to HTLV-1.

The earliest stages of ATLL development are characterized by a high expression of Tax, compared to HBZ, thus favoring viral replication and survival transcription factor activation. In late stages, Tax expression decreases until being undetectable and thus many ATLL cells express only HBZ. Results from our study indicate that Bfl-1 expression is restricted to T-cell lines infected by HTLV-1 or stably expressing both Tax and HBZ, where Tax expression is found to be higher than that of HBZ. In addition, we also demonstrated that both ectopic and stable expression of Tax up-regulates endogenous *bfl-1* in primary T-cells and thymocytes (here and (Villaudy et al., 2011)), indicating that Bfl-1 expression in HTLV-1-infected T-cells is Tax dependent. Our data show unequivocally that Tax-mediated Bfl-1 expression occurs via the canonical NF- κ B pathway. Supporting the involvement of NF- κ B in T-cell survival, others and we observed that Bay11-7082, an inhibitor of the classical NF- κ B pathway, partly down-regulates Bfl-1 (we) and Bcl-x_L ((Mori et al., 2002), and data not shown), and partially induced cell death in HTLV-1-infected T-cell lines (data not shown). In agreement with these findings, previous reports indicated that HTLV-1-infected T-cell lines and ATLL cells are quite resistant to cell death in the presence of NF- κ B inhibitors

(Agbottah et al., 2008; Kawakami et al., 1999; Mori et al., 2002; Portis et al., 2001; Sanda et al., 2006). These observations thus support the hypothesis that signaling pathways, other than the canonical NF- κ B pathway, are involved in over-expression of the antiapoptotic Bfl-1 protein. We report here that JunD and c-Jun, but not JunB, potentially activate the *bfl-1* promoter and stimulate endogenous expression of *bfl-1*. Jun members are responsible for the expression of genes involved in cell proliferation, survival and T-cell transformation (Eferl and Wagner, 2003; Shaulian, 2010). While Tax is able to activate the expression and increase the activity of JunD, c-Jun, c-Fos and Fra-1/2 *in vitro* (Fujii et al., 2000; Hall and Fujii, 2005; Iwai et al., 2001; Mori et al., 2000), only JunD seems to be constitutively activated in ATLL cells. Our study is the first to report that JunD or c-Jun synergized with Tax to activate *bfl-1* transcription. Such observation is consistent with previous identification of AP-1 binding sites in the *bfl-1* promoter (D'Souza et al., 2004; Edelman et al., 2003). In line with our data, mouse CTLL-2 T-cells expressing Tax mutant defective for both NF- κ B and AP-1 activity (Tax-M22) were unable to survive in the absence of IL-2, in contrast to cells expressing Tax-WT (Iwai et al., 2001; Iwanaga et al., 1999). Thus, our results strongly indicate that c-Jun and JunD, in addition to the NF- κ B pathway, may be involved in HTLV-1-infected T-cell survival at early stages of leukemogenesis by enhancing Tax-mediated antiapoptotic protein expression. In agreement with this hypothesis, knockdown of Tax using shRNA strategy induced down-regulation of *bfl-1* and T-cell death (data not shown).

Numerous studies showed that HBZ modulates NF- κ B and AP-1 pathways in order to enhance proliferation of HTLV-1-infected T-cells in late stages of ATLL (see review, (Matsuoka, 2010)). Present data demonstrate that HBZ is unable to *trans*-activate the *bfl-1* gene in T-cells, but it inhibits Tax-mediated *bfl-1* *trans*-activation. Supporting our observation, previous studies indicated the selective suppression of the classical NF- κ B pathway by HBZ, showing that HBZ interacts with the p65 subunit of NF- κ B, thus preventing its DNA-binding activity and inducing its degradation through a proteasome-dependent pathway (Zhao et al., 2009; Zhi et al., 2011). However, HBZ-mediated partial repression of the classical NF- κ B pathway is suppressed when Tax is overexpressed (Zhao et al., 2009). In line with this observation, we show that ectopic expression of HBZ does not have a complete suppressive

effect on Tax-mediated *bfl-1* trans-activation. Moreover, numerous papers previously indicated that the classical NF- κ B pathway stay activated by Tax in HTLV-1-infected T-cell lines, regardless the higher expression of Tax compared to HBZ (see review (Matsuoka and Jeang, 2011; Silberman and Grassmann, 2007)). HBZ heterodimerizes with classical NF- κ B and AP-1 members via bZIP domain, while its activity is mediated through AD domain (Basbous et al., 2003; Hagiya et al., 2011; Kuhlmann et al., 2007; Lemasson et al., 2007; Matsumoto et al., 2005; Ohshima et al., 2010; Thebault et al., 2004; Zhao et al., 2009). Here, we demonstrate that HBZ modulates *bfl-1* transcription induced by Jun members via both AD and bZIP domains. Moreover, HBZ inhibits c-Jun-mediated *bfl-1* gene activation and enhances *bfl-1* gene activation induced by JunD. Similar results were obtained when HBZ, Jun and Tax are over-expressed. This reinforces the notion that HBZ exerts two opposite effect on the same gene depending on its Jun partner. However, both NF- κ B and AP-1 pathways remain activated by Tax in HTLV-1-infected T-cell lines, regardless of lower HBZ expression compared to Tax. In this regard, Bfl-1 is still expressed in a T-cell line constitutively expressing both HBZ and Tax. It is noteworthy that we observed Bfl-1 protein expression in cells from two patients suffering from ATLL (data not shown). Altogether, our results suggest that Bfl-1 over-expression might have a significant relevance in the early stage of leukemogenesis associated to HTLV-1 or in ATLL cells.

Using shRNA silencing strategy, we provide here the first direct evidence that knockdown of Bfl-1 sensitizes HTLV-1-infected T-cells to death. Among the HTLV-1-transformed T-cell lines we studied, some (MT-4 and C8166-45) mainly died after Bfl-1 knockdown and moderately after Bcl-x_L knockdown. In others HTLV-1-infected T-cells (C91PL, HuT-102 and C10/MJ), silencing Bfl-1 or Bcl-x_L expression induced partial cell death (here and not shown). These apparent differences may be ascribed to the level of antiapoptotic proteins and/or to the efficiency of there down-regulation by shRNA. Supporting previous findings which demonstrated that Tax do not up-regulate Bcl-2 and that ATLL cells do not over-express Bcl-2 (Kawakami et al., 1999; Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000; Tsukahara et al., 1999), we show here that knockdown of Bcl-2 does not significantly affect survival HTLV-1-transformed T-cell lines. Thus, these results directly implicate Bfl-1, but also Bcl-x_L, in survival of HTLV-1-infected T-cells and

support the hypothesis that these two anti-apoptotic proteins may be crucial for the extended survival of pre-leukemic T-cells and potentially ATLL cells *in vivo* in the context of HTLV-1 infection.

Altogether, our results provide new insights about the mechanisms of Tax/HBZ-mediated anti-apoptotic Bfl-1 over-expression and the role of Bfl-1 in T-cell survival during leukemogenesis associated to HTLV-1 and allow us to propose a new targeted therapeutic strategy for ATLL treatment, as previously shown in B-cell malignancies (Brien et al., 2007; Morales et al., 2005; Olsson et al., 2007; Schneider et al., 1997; Simonian et al., 1997).

REFERENCES

- Adams, J.M., and S. Cory. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337.
- Agbottah, E., W.I. Yeh, R. Berro, Z. Klase, C. Pedati, K. Kehn-Hall, W. Wu, and F. Kashanchi. 2008. Two specific drugs, BMS-345541 and purvalanol A induce apoptosis of HTLV-1 infected cells through inhibition of the NF-kappaB and cell cycle pathways. *AIDS Res Ther* 5:12.
- Arnold, J., B. Zimmerman, M. Li, M.D. Lairmore, and P.L. Green. 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112:3788-3797.
- Basbous, J., C. Arpin, G. Gaudray, M. Piechaczyk, C. Devaux, and J.M. Mesnard. 2003. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* 278:43620-43627.
- Bellon, M., H.H. Baydoun, Y. Yao, and C. Nicot. 2010. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* 115:2441-2448.
- Brien, G., M.C. Trescol-Biemont, and N. Bonnefoy-Berard. 2007. Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene* 26:5828-5832.
- Cavrois, M., S. Wain-Hobson, A. Gessain, Y. Plumelle, and E. Wattel. 1996. Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88:4646-4650.
- Chen, C., L.C. Edelstein, and C. Gelinas. 2000. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20:2687-2695.
- Chlichlia, K., and K. Khazaie. 2010. HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem Biol Interact* 188:359-365.
- Chung, H.K., H.A. Young, P.K. Goon, G. Heidecker, G.L. Princler, O. Shimozaoto, G.P. Taylor, C.R. Bangham, and D. Derse. 2003. Activation of interleukin-13 expression in T cells from HTLV-1-infected individuals and in chronically infected cell lines. *Blood* 102:4130-4136.
- Cottalorda, A., C. Vershelde, A. Marcais, M. Tomkowiak, P. Musette, S. Uematsu, S. Akira, J. Marvel, and N. Bonnefoy-Berard. 2006. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol* 36:1684-1693.
- D'Souza, B., M. Rowe, and D. Walls. 2000. The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Virol* 74:6652-6658.
- D'Souza, B.N., L.C. Edelstein, P.M. Pegman, S.M. Smith, S.T. Loughran, A. Clarke, A. Mehl, M. Rowe, C. Gelinas, and D. Walls. 2004. Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol* 78:1800-1816.
- de la Fuente, C., L. Wang, D. Wang, L. Deng, K. Wu, H. Li, L.D. Stein, T. Denny, F. Coffman, K. Kehn, S. Baylor, A. Maddukuri, A. Pumfery, and F. Kashanchi. 2003. Paradoxical effects of a stress signal on pro- and anti-apoptotic machinery in HTLV-1 Tax expressing cells. *Mol Cell Biochem* 245:99-113.

- Edelstein, L.C., L. Lagos, M. Simmons, H. Tirumalai, and C. Gelinas. 2003. NF-kappa B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol Cell Biol* 23:2749-2761.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868.
- Etoh, K., S. Tamiya, K. Yamaguchi, A. Okayama, H. Tsubouchi, T. Ideta, N. Mueller, K. Takatsuki, and M. Matsuoka. 1997. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 57:4862-4867.
- Franchini, G., F. Wong-Staal, and R.C. Gallo. 1984. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6207-6211.
- Fujii, M., K. Iwai, M. Oie, M. Fukushi, N. Yamamoto, M. Kannagi, and N. Mori. 2000. Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1603-1606.
- Fujita, M., and H. Shiku. 1995. Differences in sensitivity to induction of apoptosis among rat fibroblast cells transformed by HTLV-I tax gene or cellular nuclear oncogenes. *Oncogene* 11:15-20.
- Furukawa, Y., M. Osame, R. Kubota, M. Tara, and M. Yoshida. 1995. Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) Tax is expressed at the same level in infected cells of HTLV-1-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis patients as in asymptomatic carriers but at a lower level in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 85:1865-1870.
- Grassmann, R., M. Aboud, and K.T. Jeang. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24:5976-5985.
- Grassmann, R., S. Berchtold, I. Radant, M. Alt, B. Fleckenstein, J.G. Sodroski, W.A. Haseltine, and U. Ramstedt. 1992. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J Virol* 66:4570-4575.
- Grossman, W.J., J.T. Kimata, F.H. Wong, M. Zutter, T.J. Ley, and L. Ratner. 1995. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1057-1061.
- Grumont, R.J., I.J. Rourke, and S. Gerondakis. 1999. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:400-411.
- Hagiya, K., J. Yasunaga, Y. Satou, K. Ohshima, and M. Matsuoka. 2011. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 8:19.
- Hall, W.W., and M. Fujii. 2005. Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24:5965-5975.
- Hasegawa, H., H. Sawa, M.J. Lewis, Y. Orba, N. Sheehy, Y. Yamamoto, T. Ichinohe, Y. Tsunetsugu-Yokota, H. Katano, H. Takahashi, J. Matsuda, T. Sata, T. Kurata, K. Nagashima, and W.W. Hall. 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 12:466-472.
- Hivin, P., M. Frederic, C. Arpin-Andre, J. Basbous, B. Gay, S. Thebault, and J.M. Mesnard. 2005. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci* 118:1355-1362.

- Ishikawa, C., S. Nakachi, M. Senba, M. Sugai, and N. Mori. 2010. Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis*
- Iwai, K., N. Mori, M. Oie, N. Yamamoto, and M. Fujii. 2001. Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* 279:38-46.
- Iwanaga, Y., T. Tsukahara, T. Ohashi, Y. Tanaka, M. Arai, M. Nakamura, K. Ohtani, Y. Koya, M. Kannagi, N. Yamamoto, and M. Fujii. 1999. Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein abrogates interleukin-2 dependence in a mouse T-cell line. *J Virol* 73:1271-1277.
- Journo, C., E. Douceron, and R. Mahieux. 2009. HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* 4:425-440.
- Kawakami, A., T. Nakashima, H. Sakai, S. Urayama, S. Yamasaki, A. Hida, M. Tsuboi, H. Nakamura, H. Ida, K. Migita, Y. Kawabe, and K. Eguchi. 1999. Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* 94:3847-3854.
- Kuhlmann, A.S., J. Villaudy, L. Gazzolo, M. Castellazzi, J.M. Mesnard, and M. Duc Dodon. 2007. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4:92.
- Lam, L.T., R.E. Davis, J. Pierce, M. Hepperle, Y. Xu, M. Hottelet, Y. Nong, D. Wen, J. Adams, L. Dang, and L.M. Staudt. 2005. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11:28-40.
- Lamsoul, I., J. Lodewick, S. Lebrun, R. Brasseur, A. Burny, R.B. Gaynor, and F. Bex. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 25:10391-10406.
- Lee, H.H., H. Dadgostar, Q. Cheng, J. Shu, and G. Cheng. 1999. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9136-9141.
- Lemasson, I., M.R. Lewis, N. Polakowski, P. Hivin, M.H. Cavanagh, S. Thebault, B. Barbeau, J.K. Nyborg, and J.M. Mesnard. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J Virol* 81:1543-1553.
- Lemasson, I., V. Robert-Hebmann, S. Hamaia, M. Duc Dodon, L. Gazzolo, and C. Devaux. 1997. Transrepression of lck gene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40tax. *J Virol* 71:1975-1983.
- Li, M., and P.L. Green. 2007. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 142:159-168.
- Matsumoto, J., T. Ohshima, O. Isono, and K. Shimotohno. 2005. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* 24:1001-1010.
- Matsuoka, M. 2010. HTLV-1 bZIP factor gene: Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Mol Aspects Med* 31:359-366.
- Matsuoka, M., and K.T. Jeang. 2011. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* 30:1379-1389.

- Meertens, L., S. Chevalier, R. Weil, A. Gessain, and R. Mahieux. 2004a. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J Biol Chem* 279:43307-43320.
- Meertens, L., C. Pise-Masison, N. Quere, J. Brady, A. Gessain, and R. Mahieux. 2004b. Utilization of the CBP but not the p300 co-activator by human T-lymphotropic virus type-2 Tax for p53 inhibition. *Oncogene* 23:5447-5458.
- Morales, A.A., A. Olsson, F. Celsing, A. Osterborg, M. Jondal, and L.M. Osorio. 2005. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 113:730-737.
- Mori, N., M. Fujii, G. Cheng, S. Ikeda, Y. Yamasaki, Y. Yamada, M. Tomonaga, and N. Yamamoto. 2001. Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus genes* 22:279-287.
- Mori, N., M. Fujii, K. Iwai, S. Ikeda, Y. Yamasaki, T. Hata, Y. Yamada, Y. Tanaka, M. Tomonaga, and N. Yamamoto. 2000. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95:3915-3921.
- Mori, N., Y. Yamada, S. Ikeda, Y. Yamasaki, K. Tsukasaki, Y. Tanaka, M. Tomonaga, N. Yamamoto, and M. Fujii. 2002. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 100:1828-1834.
- Nagakubo, D., Z. Jin, K. Hieshima, T. Nakayama, A.K. Shirakawa, Y. Tanaka, H. Hasegawa, T. Hayashi, K. Tsukasaki, Y. Yamada, and O. Yoshie. 2007. Expression of CCR9 in HTLV-1+ T cells and ATL cells expressing Tax. *Int J Cancer* 120:1591-1597.
- Nagata, K., K. Ohtani, M. Nakamura, and K. Sugamura. 1989. Activation of endogenous c-fos proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax protein in the human T-cell line, Jurkat. *J Virol* 63:3220-3226.
- Nakayama, T., K. Hieshima, T. Arao, Z. Jin, D. Nagakubo, A.K. Shirakawa, Y. Yamada, M. Fujii, N. Oiso, A. Kawada, K. Nishio, and O. Yoshie. 2008. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene* 27:3221-3232.
- Nerenberg, M., S.H. Hinrichs, R.K. Reynolds, G. Khoury, and G. Jay. 1987. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 237:1324-1329.
- Nicot, C., R. Mahieux, S. Takemoto, and G. Franchini. 2000. Bcl-X(L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. *Blood* 96:275-281.
- Ohshima, T., R. Mukai, N. Nakahara, J. Matsumoto, O. Isono, Y. Kobayashi, S. Takahashi, and K. Shimotohno. 2010. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *Journal of cellular biochemistry* 111:187-194.
- Olsson, A., M. Norberg, A. Okvist, K. Derkow, A. Choudhury, G. Tobin, F. Celsing, A. Osterborg, R. Rosenquist, M. Jondal, and L.M. Osorio. 2007. Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 97:769-777.
- Peloponese, J.M., Jr., and K.T. Jeang. 2006. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J Biol Chem* 281:8927-8938.

- Polster, B.M., J. Pevsner, and J.M. Hardwick. 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1644:211-227.
- Portis, T., J.C. Harding, and L. Ratner. 2001. The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. *Blood* 98:1200-1208.
- Portis, T., and R. Longnecker. 2004. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 23:8619-8628.
- Postigo, A., and P.E. Ferrer. 2009. Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes Infect* 11:1071-1078.
- Pozzatti, R., J. Vogel, and G. Jay. 1990. The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Mol Cell Biol* 10:413-417.
- Robek, M.D., and L. Ratner. 1999. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol* 73:4856-4865.
- Sanda, T., K. Asamitsu, H. Ogura, S. Iida, A. Utsunomiya, R. Ueda, and T. Okamoto. 2006. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 20:590-598.
- Satou, Y., J. Yasunaga, M. Yoshida, and M. Matsuoka. 2006. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:720-725.
- Satou, Y., J. Yasunaga, T. Zhao, M. Yoshida, P. Miyazato, K. Takai, K. Shimizu, K. Ohshima, P.L. Green, N. Ohkura, T. Yamaguchi, M. Ono, S. Sakaguchi, and M. Matsuoka. 2011. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS pathogens* 7:e1001274.
- Schneider, T.J., D. Grillo, L.C. Foote, G.E. Nunez, and T.L. Rothstein. 1997. Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 159:4834-4839.
- Shaulian, E. 2010. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22:894-899.
- Silbermann, K., and R. Grassmann. 2007. Human T cell leukemia virus type 1 tax-induced signals in cell survival, proliferation, and transformation. *Signal transduction* 7:34-52.
- Simonian, P.L., D.A. Grillo, and G. Nunez. 1997. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 90:1208-1216.
- Smith, M.R., and W.C. Greene. 1990. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* 4:1875-1885.
- Sugamura, K., M. Fujii, M. Kannagi, M. Sakitani, M. Takeuchi, and Y. Hinuma. 1984. Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int J Cancer* 34:221-228.
- Sun, S., J. Elwood, and W.C. Greene. 1996. Both amino- and carboxyl-terminal sequences within I kappa B alpha regulate its inducible degradation. *Mol Cell Biol* 16:1058-1065.

- Takeda, S., M. Maeda, S. Morikawa, Y. Taniguchi, J. Yasunaga, K. Nosaka, Y. Tanaka, and M. Matsuoka. 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 109:559-567.
- Taylor, J.M., and C. Nicot. 2008. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 13:733-747.
- Thebault, S., J. Basbous, P. Hivin, C. Devaux, and J.M. Mesnard. 2004. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 562:165-170.
- Tsukahara, T., M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, and M. Fujii. 1999. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol* 73:7981-7987.
- Usui, T., K. Yanagihara, K. Tsukasaki, K. Murata, H. Hasegawa, Y. Yamada, and S. Kamihira. 2008. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* 5:34.
- Villaudy, J., M. Wencker, N. Gadot, N.A. Gillet, J.Y. Scoazec, L. Gazzolo, M.G. Manz, C.R. Bangham, and M.D. Dodon. 2011. HTLV-1 Propels Thymic Human T Cell Development in "Human Immune System" Rag2 gamma c Mice. *PLoS pathogens* 7:e1002231.
- Wang, C.Y., D.C. Guttridge, M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:5923-5929.
- White, E. 2006. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell death and differentiation* 13:1371-1377.
- Yoshida, M., Y. Satou, J. Yasunaga, J. Fujisawa, and M. Matsuoka. 2008. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol* 82:9359-9368.
- Zane, L., D. Sibon, C. Legras, J. Lachuer, A. Wierinckx, P. Mehlen, M.H. Delfau-Larue, A. Gessain, O. Gout, C. Pinatel, A. Lancon, F. Mortreux, and E. Wattel. 2010. Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8+ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* 407:341-351.
- Zhao, T., J. Yasunaga, Y. Satou, M. Nakao, M. Takahashi, M. Fujii, and M. Matsuoka. 2009. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* 113:2755-2764.
- Zhi, H., L. Yang, Y.L. Kuo, Y.K. Ho, H.M. Shih, and C.Z. Giam. 2011. NF-kappaB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS pathogens* 7:e1002025.
- Zong, W.X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:382-387.

FOOTNOTES

Acknowledgements-We are grateful to F. Bex, B. Barbeau, E. Wattel, D. Walls and J. Denis for helpful discussions, and F. Duchamp, E. Combe, J. Aubin and C. Bardou for technical assistance. We thank the staff from the platform of the US8 / UMS3444 BioSciences Gerland – Lyon Sud (Flow cytometry, CelluloNet, L3 laboratory, PAP, Genetic and Vectorology analysis). This work is supported by institutional grants from INSERM and UCBL, and additional supports from associations (Région Rhône-Alpes Cluster 10, cent pour sang la vie, and Fondation de France). H.M. was supported by a fellowship from CIFRE convention (Imaxio Biotech). HV is a permanent CNRS researcher.

The abbreviations used are: HTLV-1, human T-cell leukemia virus; ATLL, Adult T-cell leukemia/lymphoma; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; AP-1, activator protein-1; HBZ, HTLV-1 basic leucine zipper factor; Bfl-1, Bcl-2 fetal liver; Bcl-x_L, Bcl-2 like long; Bcl-2, B-cell lymphoma gene-2; EBV, Epstein-barr virus; LMP-1, latent membrane protein 1; EBNA2, EBV nuclear antigen 2; WT, wild type; I κ B α DN, mAbs, monoclonal antibodies; Luc, luciferase; dominant-negative I κ B α ; Δ AD, deleted activation domain; Δ bZip, deleted basic leucine zipper; shRNA, small hairpin RNA

FIGURES LEGENDS

FIGURE 1. Antiapoptotic Bfl-1 transcripts and proteins are expressed in HTLV-1-infected T-cell lines, but not in uninfected leukemic T-cell lines. *A*, Relative expression of specific *bfl-1*, *tax* and *hbx* mRNA was normalized using housekeeping genes after real-time RT-PCR of uninfected (Sup-T1, Molt-4, Jurkat, HuT-78 and CEM) and HTLV-1-infected (MT-4, C8166-45, SP, MT-2, HuT-102, C91PL and FC36.22) T-cell lines. *B*, Protein levels for Bfl-1 and Tax in uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines were determined by Western blotting. The loading control was the housekeeping β -actin protein. Results are from one representative experiment of two to three.

FIGURE 2. The Bfl-1 gene is transcriptionally activated by Tax in human T-cells. *A*, Expression of *tax* and *bfl-1* messengers in JPX-9 cells at different times post-treatment with 20 μ M of CdCl₂. The relative expression of specific *tax* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes after real-time RT-PCR. Data are presented as fold induction by comparison to untreated cells, where relative expression was arbitrary set up to one. Results are from one representative experiment of two. *B*, Expression of *bfl-1* transcript in primary CD4⁺ T-cells and Tax-expressing CD4⁺ T-cells derived from transduced-PBMC by real-time RT-PCR. The relative expression of *tax* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes. Results are from one representative experiment of three. ND = not determined

FIGURE 3. Tax trans-activates the bfl-1 gene via the NF- κ B-pathway. *A*, Effect of wild type Tax (Tax-WT) and Tax mutants (Tax-M47 and Tax-M22) on the expression of endogenous *bfl-1* transcripts. Empty-vector, Tax-WT, Tax-M22 or Tax-M47 expression vectors (0.3 μ g) were transfected into HeLa cells. After 2 days, the relative expression of *tax* (*left panel*) and *bfl-1* (*right panel*) mRNA was normalized using housekeeping gene by real-time RT-PCR. Results are expressed

as mean \pm SD of three independent experiments. *B*, Effect of I κ B α DN on Tax-mediated activation of the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g), with pRL-TK-Ruc (0.1 μ g) plasmids, with increasing amounts of I κ B α DN (1.56 to 100 ng) and with empty or Tax-WT (0.3 μ g) expression vectors. After 2 days, luciferase activity was normalized to TK-Ruc. Normalized luciferase values were expressed as *trans*-activation (n-fold) over control empty vector. The bars represent the mean \pm SD of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for I κ B α and Tax in lysates of HeLa samples were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. *C*, Effect of I κ B α DN on Tax-mediated endogenous *bfl-1* mRNA expression. HeLa cells were co-transfected with I κ B α DN (100 ng) and empty or Tax-WT (0.3 μ g) expression vectors. After 2 days, the relative expression of *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping gene by real-time RT-PCR. Results are expressed as mean \pm SD of triplicates.

FIGURE 4. Tax synergizes with either c-Jun or JunD to *trans*-activate the *bfl-1* gene. *A*, Effect of Tax on c-Jun-mediated activation of the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids and either with c-Jun- (6.25 ng) and increasing amounts of Tax-WT- (0.2 and 0.4 μ g) expression vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for Tax and c-Jun in lysates of HeLa samples were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *B*, Effect of Tax on JunD-mediated activation of the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids and either with different amounts of Tax-WT- (0.2 and 0.4 μ g) and JunD- (6.25 ng) expression vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for Tax and JunD (lower panel) in lysates of HeLa samples were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *C*, Effect of Tax on Jun-mediated endogenous *bfl-1* mRNA expression. HeLa cells were transfected with Tax-WT (0.3 μ g), c-Jun (6.25 ng) or JunD (6.25 ng) expressing vectors alone or co-transfected with Tax-WT plus c-Jun or Tax-WT plus JunD expressing vectors. After 2 days, the relative expression of *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping gene by real-time RT-PCR. Results are expressed as mean \pm SD of triplicates.

FIGURE 5. HBZ modulates Jun-mediated *bfl-1* promoter activation via both activation and leucine zipper domains. *A*, HBZ inhibits c-Jun-mediated activation of the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids and either with increasing amounts of WT HBZ- (6.25 to 25 ng) and c-Jun- (25 ng). Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for WT HBZ and c-Jun in lysates of HeLa samples were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *B*, HBZ synergizes with JunD to activate the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids and either with increasing amounts of WT HBZ- (6.25 to 25 ng) and JunD- (25 ng) expression vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for WT HBZ and JunD in lysates of HeLa samples were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *C*, Both activation and leucine zipper are required for full HBZ activities. HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids and either with HBZ (WT, Δ AD, Δ bZIP, 25 ng), or c-Jun (25 ng, *left panel*) or JunD (25 ng, *right panel*) expressing vectors alone or with HBZ (WT, Δ AD, Δ bZIP) plus c-Jun or HBZ (WT, Δ AD, Δ bZIP) plus JunD expressing vectors. After 2 days, luciferase activity

was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments.

FIGURE 6. HBZ modulates the synergistic effect between Tax and AP-1 members on the activation of the *bfl-1* promoter in transient transfection models. *A*, Effect of HBZ on Tax/c-Jun- (*left panel*) or Tax/JunD- (*right panel*) mediated *bfl-1* promoter activation. HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 µg) and pRL-TK (0.1 µg) plasmids and with c-Jun or JunD (6.25 ng), HBZ (25 ng), and Tax (250 ng) expressing vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. *B*, Effect of HBZ on Tax/c-Jun- (*left panel*) or Tax/JunD- (*right panel*) mediated *bfl-1* promoter activation. Jurkat T-cell line was nucleofected with Bfl-1-Luc promoter (4 µg) and pRL-TK (2 µg) plasmids and with Tax (3 µg), and/or HBZ (1.5 µg), and/or c-Jun or JunD (1.5 µg) expressing vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. *C*, Expression of *bfl-1* transcript in parental and stably Tax/HBZ-expressing Jurkat cells (Clone E12) by real-time RT-PCR. The relative expression of specific *tax*, *hbz* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes. Results are from one representative experiment of three.

FIGURE 7. Down-regulation of Bfl-1 expression induced spontaneous HTLV-1-infected T-cell death. Cells were transduced with lentivirus expressing Luc-Ctl or Bfl-1 shRNA. *A*, After 5 days, the knockdown of Bfl-1 by the specific shRNA in transduced uninfected (Jurkat) and HTLV-1-infected (C91PL and MT-4) T-cell lines was controlled by western blotting using specific mAb against Bfl-1 (*upper panels*). Comparable protein loading was confirmed using a mAb specific for the housekeeping β-actin protein (*lower panels*). *B*, Percent of dead cells (PI⁺) was measured by flow cytometry 5 (□) to 7 (■) days post-transduction. Results are from one representative experiment of three to five.

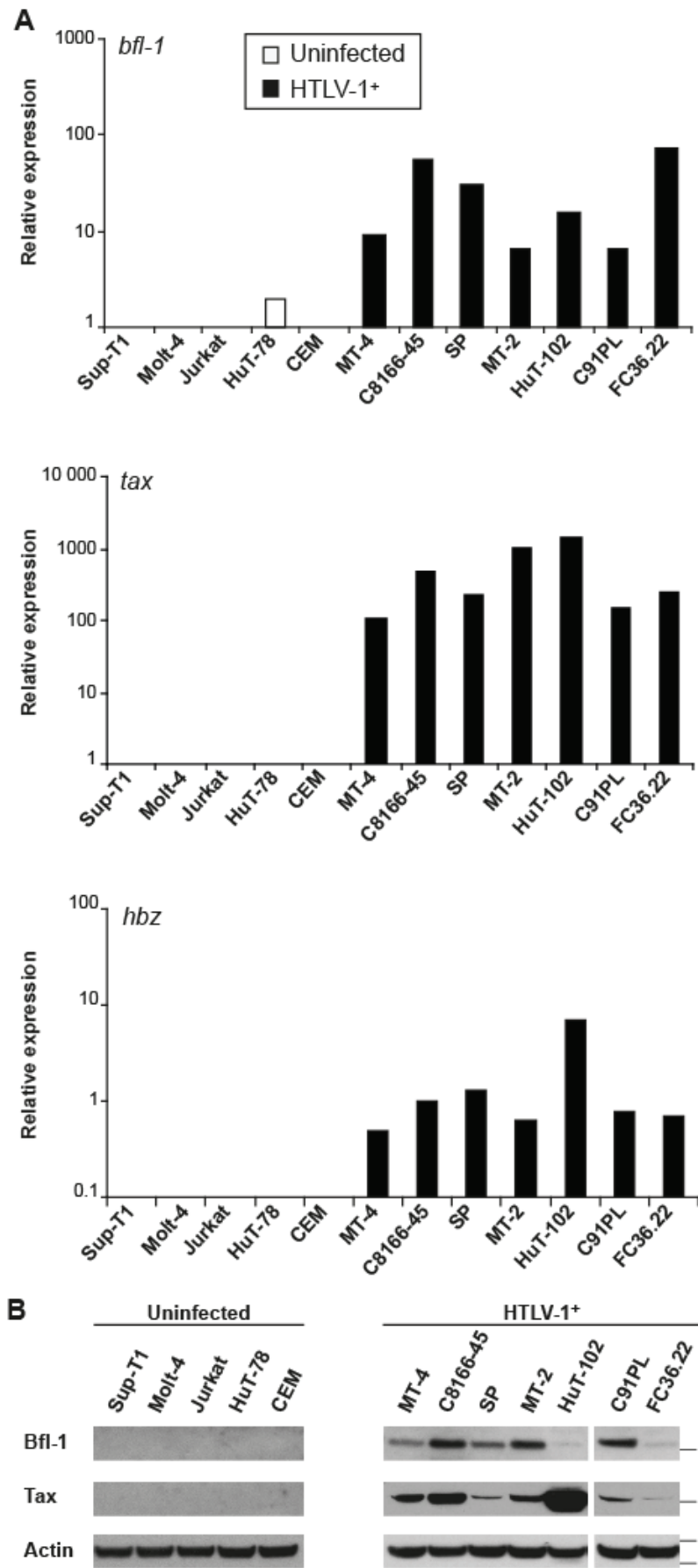


Figure 1- Macaire et al.

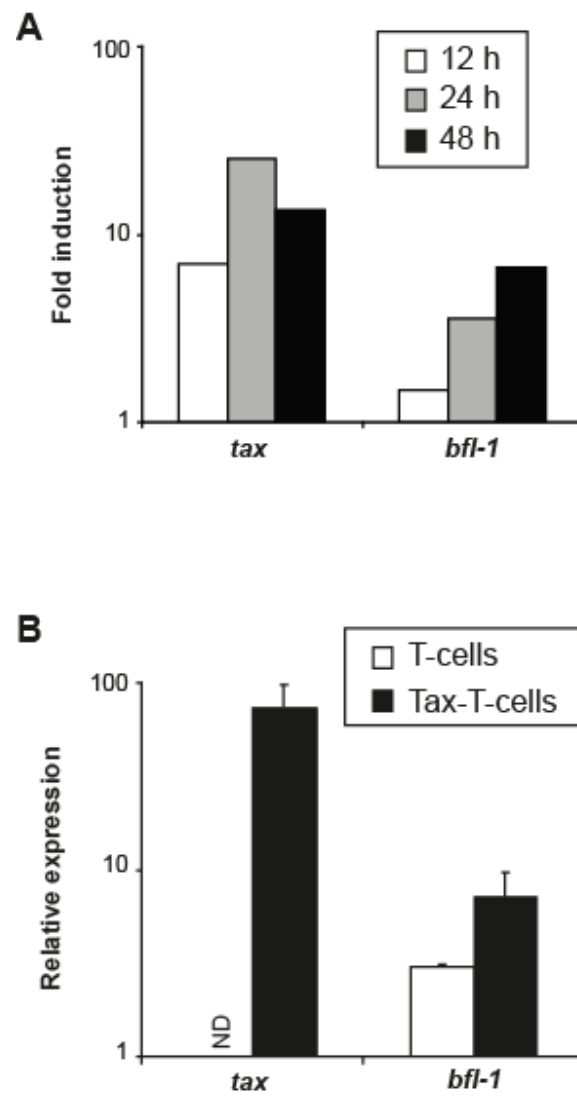


Figure 2 - Macaire et al.

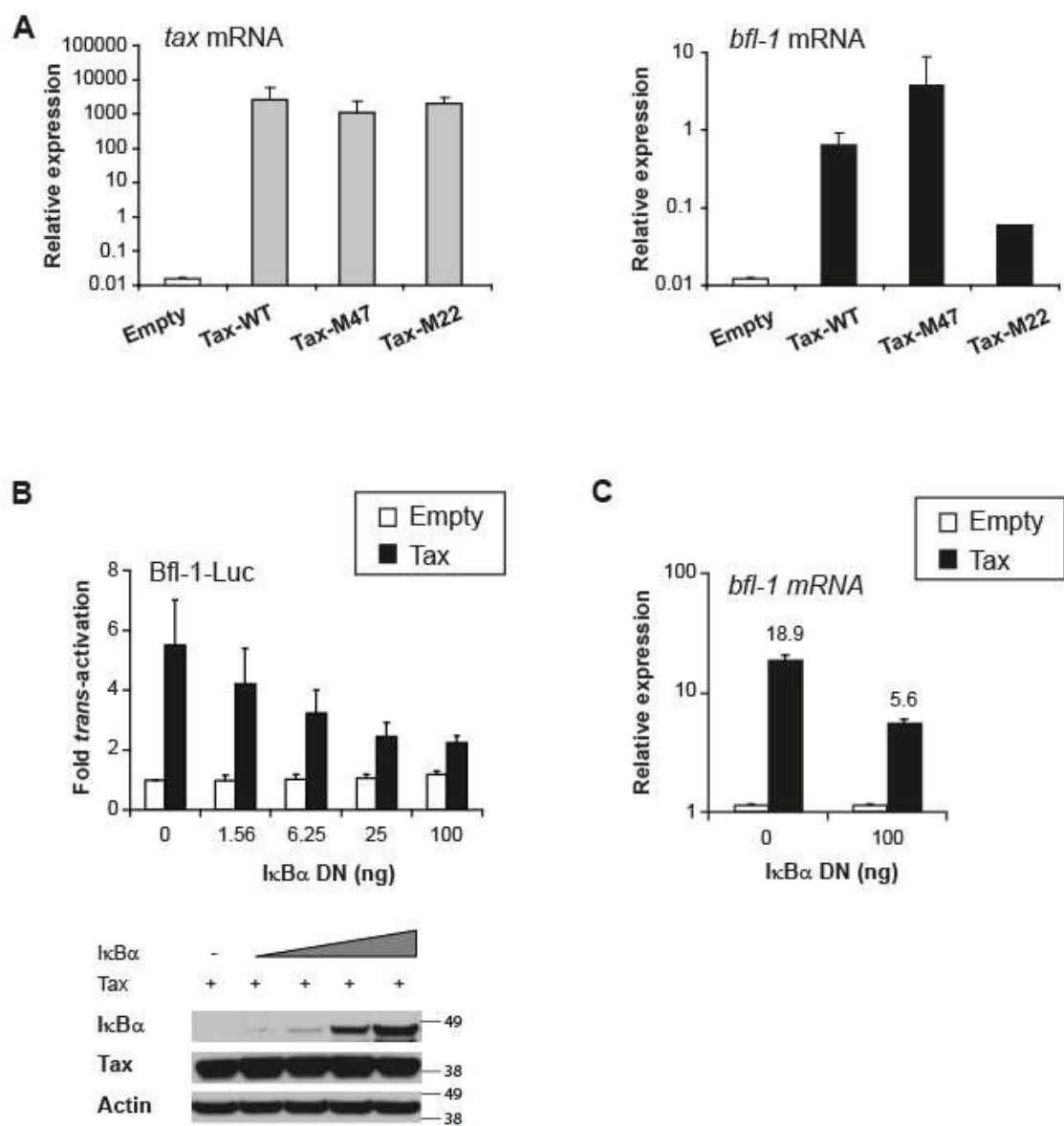


Figure 3 - Macaire et al.

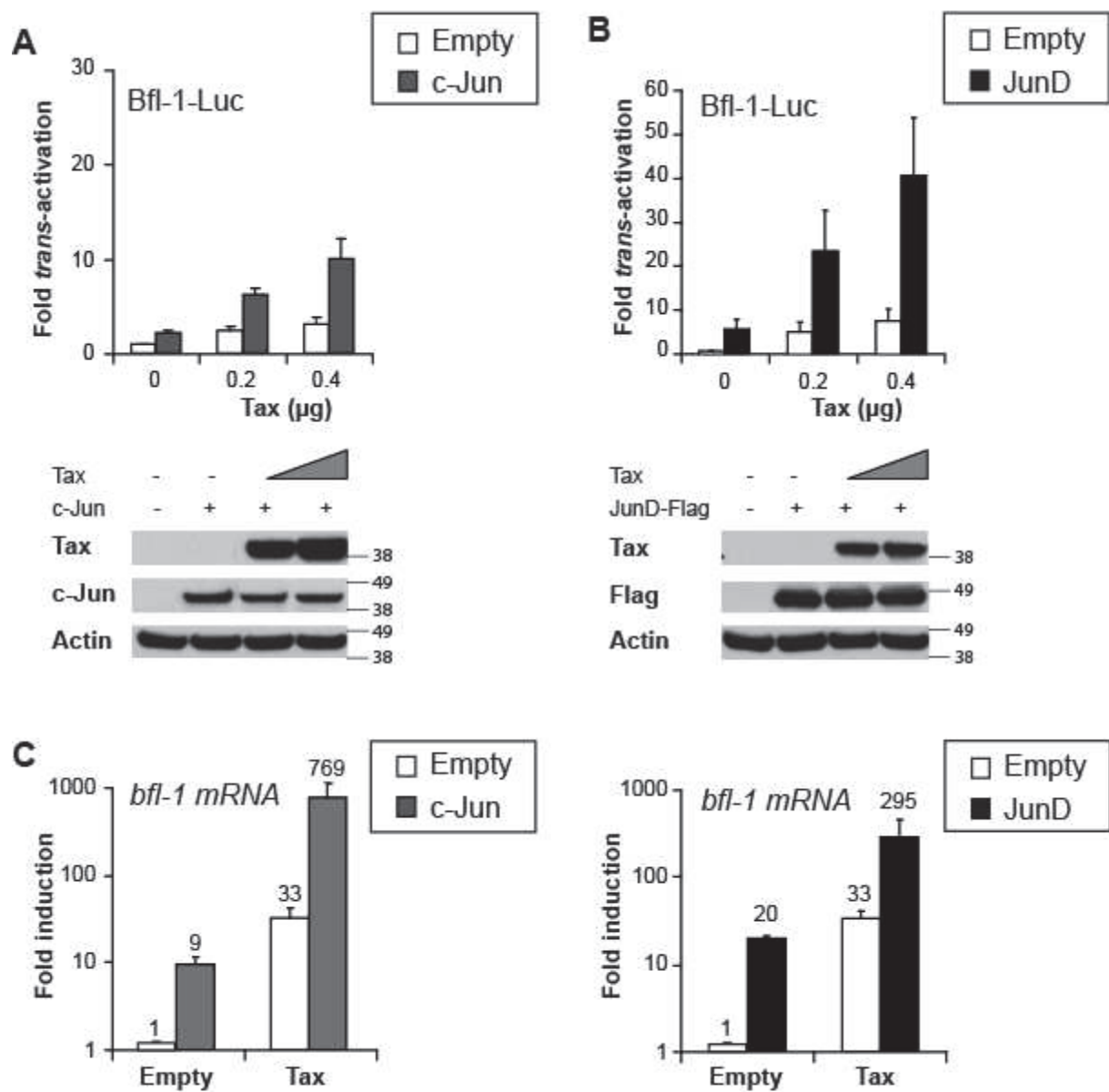


Figure 4 - Macaire et al.

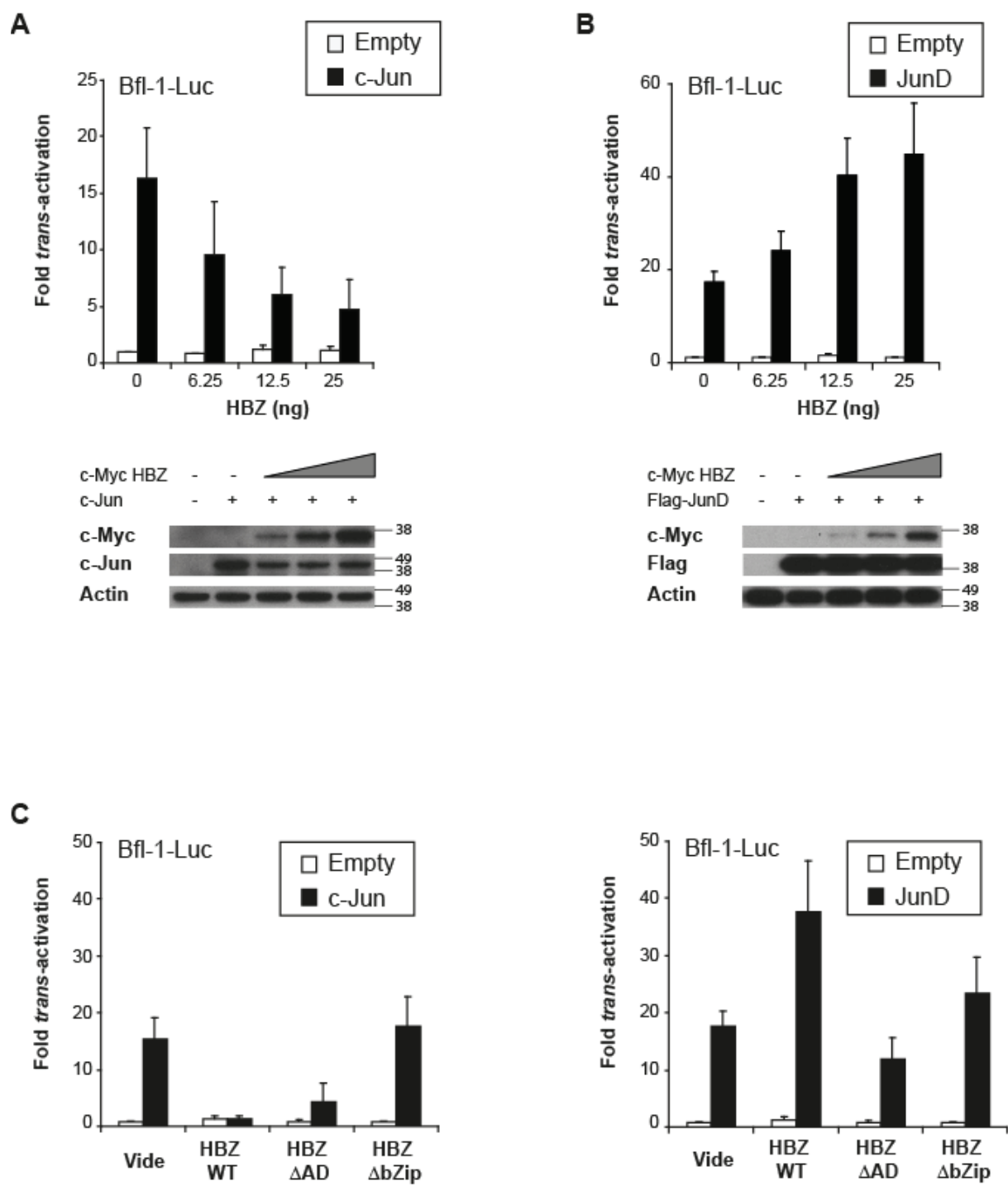
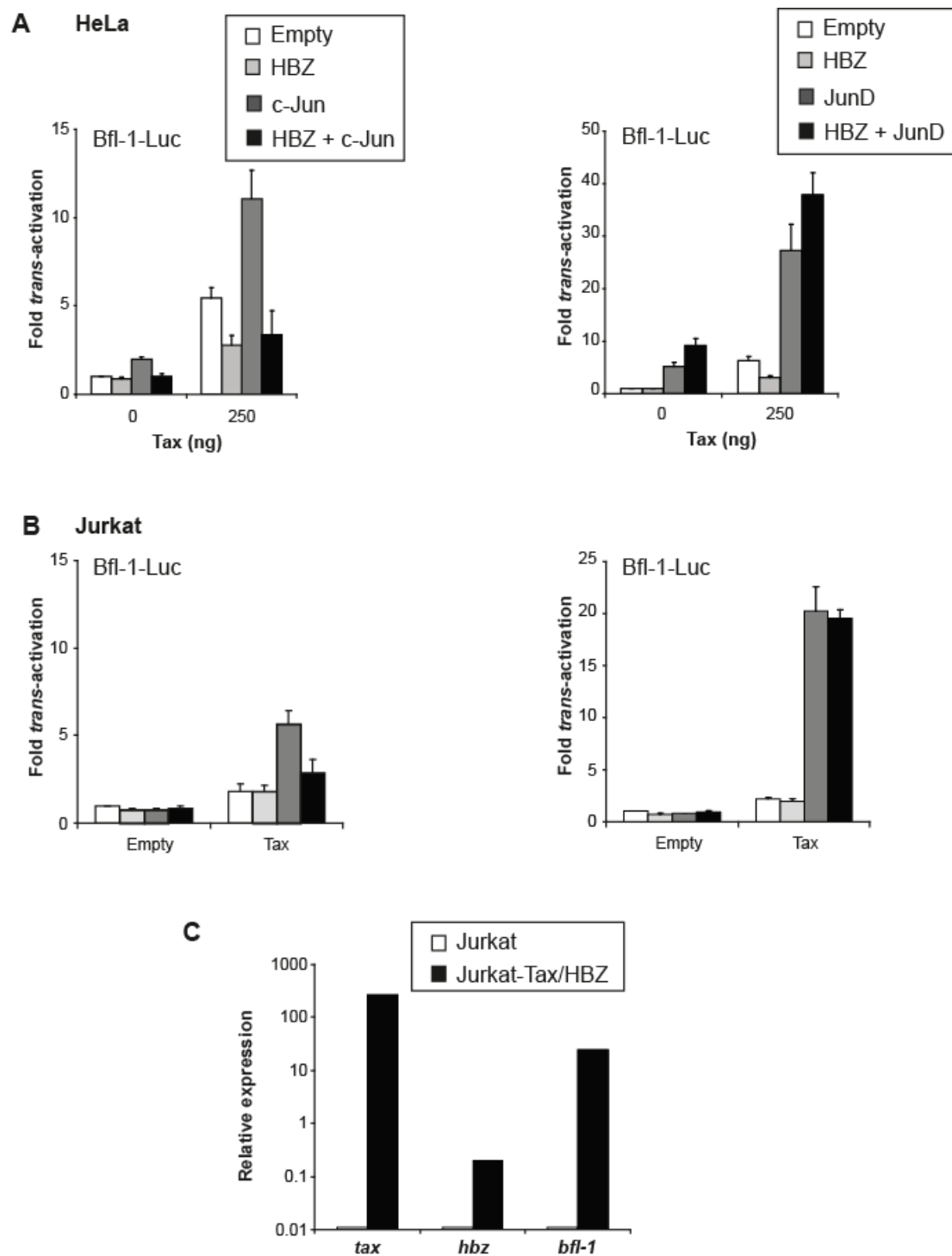


Figure 5- Macaire et al.



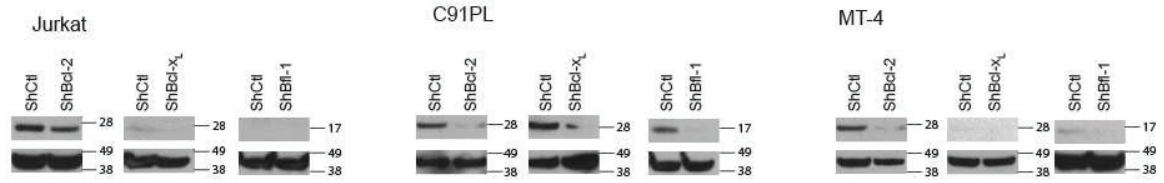
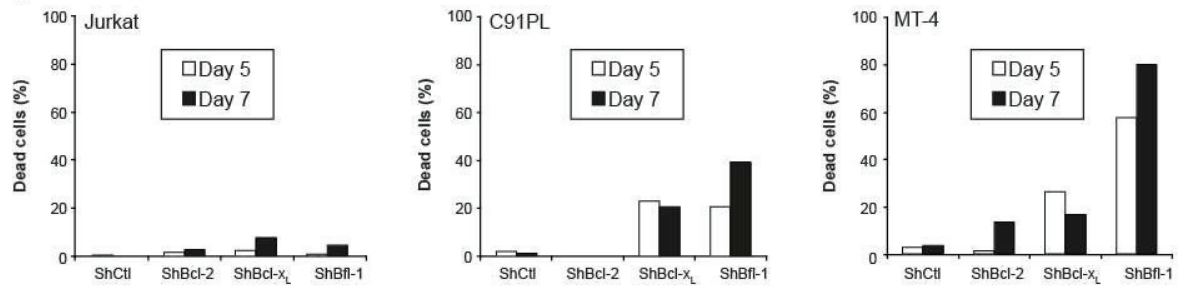
A**B**

Figure 7 - Macaire et al.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplementary Methods

The sequences of RT-PCR and shRNA primers are summarized in Table S1 and S2, respectively

Table S1. **List of primers used for real time RT-PCR**

Gene Name	Orientation	Sequence (5' to 3')
<i>bcl-2</i>	Forward	TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC
	Reverse	GTTTGGGGCAGGCATGTTGAC
<i>bcl-x_L</i>	Forward	CGRGGAAAGCGTAGACAAGGA
	Reverse	ATTCAGGTAAGTGGCCATCCAA
<i>bfl-1 (bcl-2/A1)</i>	Forward	ACAGGCTGGCTCAGGACTATCT
	Reverse	CTCTGGACGTTTTGCTTGGAC
<i>tax</i>	Forward	TGTTTGGAGACTGTGTACAAGGCG
	Reverse	GTTGTATGAGTGATTGGCGGGGTAA
<i>hbz</i>	Forward	ATGGCGGCCTCAGGGCTGT
	Reverse	TGGAGGGCCCCGTCGCAG
<i>gus</i>	Forward	GATTGCCAATGAAACCAGGTATCCC
	Reverse	ACACGCAGGTGGTATCAGTCTTG
<i>hpri</i>	Forward	ACCCGCAGCCCTGGCGTCGTGATTA
	Reverse	CCATCTCCTTCATCACATCTCGAGC

Table S2. **Target sequences of shRNAs**

Gene Name	Sequence
<i>Luc</i>	CTTACGCTGAGTACTTCGA
<i>Bcl-2</i>	AACCGGGAGATAGTGATGAAG
<i>bcl-x_L</i>	AGGATACAGCTGGAGTCA
<i>bfl-1 (bcl-2/A1)</i>	AAGGAGTTTGAAGACGGCATC

Supplementary Data

Table S3. **Phenotype of uninfected and HTLV-1-infected human T-cell lines**

T-cell lines	T-cell markers (%) ^a					Activation molecules (MFI) ^b	
	CD2	CD3	CD4	CD8	TCR- α/β	CD25	HLA-DR
HTLV ⁻							
Sup-T1	+	+	+	+	-	5	4
Molt-4	-	+	+	+	-	6	6
Jurkat	+	+	+	-	+	5	5
CEM	-	-	+	-	-	4	4
HuT-78	+	+	+	-	+	823	617
HTLV-1 ⁺							
SP	+	+	+	+	-	752	9
C91PL	-	-	+	-	+	55	90
MT-4	+	-	+	-	-	820	615
C8166-45	-	-	+	-	-	163	404
MT-2	+	-	+	-	+	1150	697
HuT-102	+	-	+	-	-	561	500
FC36.22	+	+	-	+	+	1094	841

^a (-) and (+) are used to notify that 0% and 100% of cells were negative and positive for staining, respectively

^b MFI corresponds to mean of fluorescence intensity

Data are shown as mean of three to five separate experiments

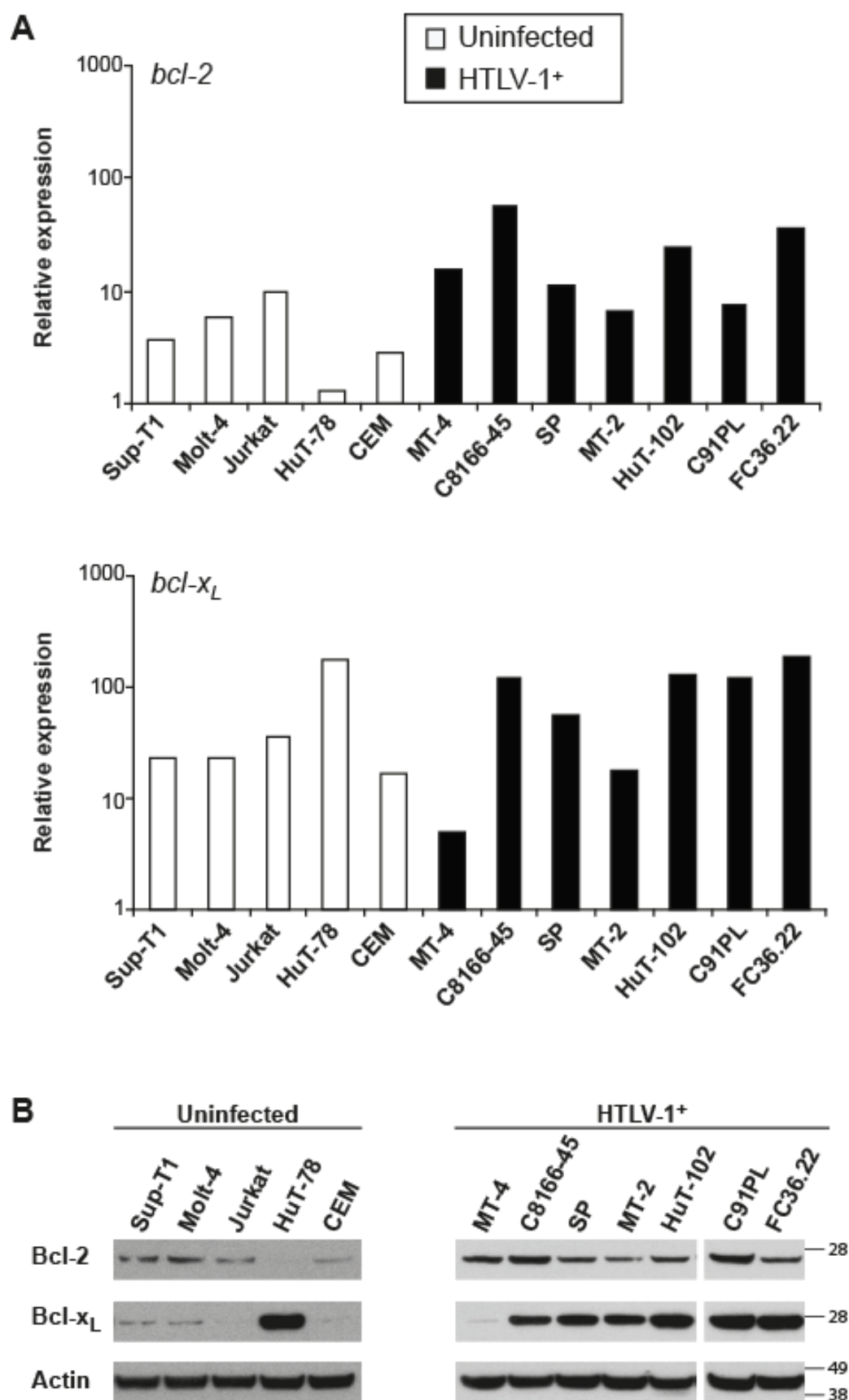
SD were below 20%

Supplementary Figure 1. **Expression of Bcl-2, Bcl-x_L, HTLV-1 Tax and HBZ in human uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines.** *A*, Relative expression of the specific *bcl-2*, *bcl-x_L*, *tax* and *hbz* mRNA was normalized using housekeeping gene after real-time RT-PCR. *B*, Protein levels for Bcl-2, Bcl-x_L, and Tax in uninfected (Sup-T1, Molt-4, Jurkat, HuT-78 and CEM) and HTLV-1-infected (MT-4, C8166-45, SP, MT-2, HuT-102, C91PL and FC36.22) T-cell lines were determined by western

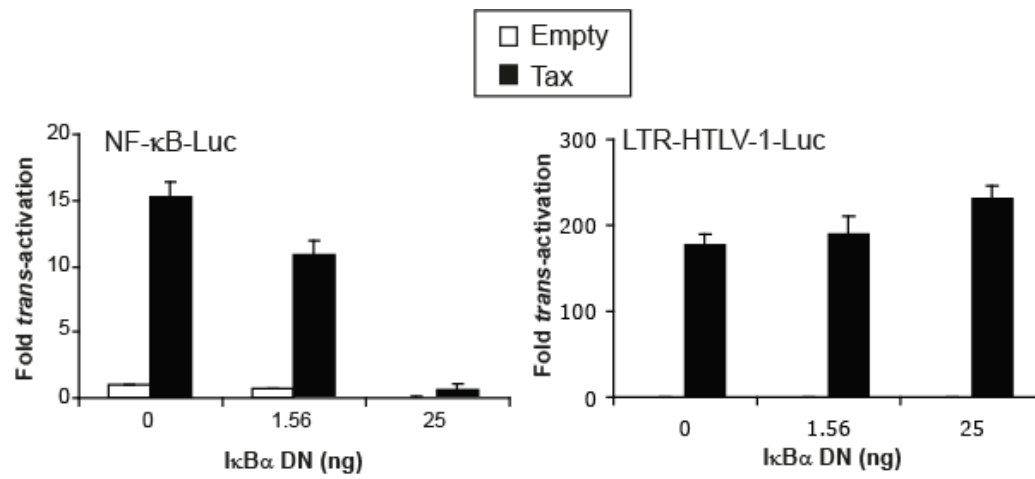
blotting. The loading control was the housekeeping β -actin protein. Results are from one representative experiment of two to three.

Supplementary Figure 2. **Effect of I κ B α DN on Tax-mediated activation of the NF- κ B promoter.** HeLa cells were co-transfected with either NF- κ B-Luc or 5'LTR-HTLV-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK-Ruc (0.1 μ g) plasmids, and different amounts of I κ B α DN (1.56 and 25 ng), and either empty or Tax-WT (0.3 μ g) expressing vectors. After 2 days, luciferase activity was normalized to TK-Ruc activity as in Figure 3. Data are presented as relative fold *trans*-activation by comparison to the basal NF- κ B or LTR-HTLV-1 luciferase activity obtained using empty-vector, which was arbitrary set up to one. The bars represent the mean \pm SD of three independent experiments.

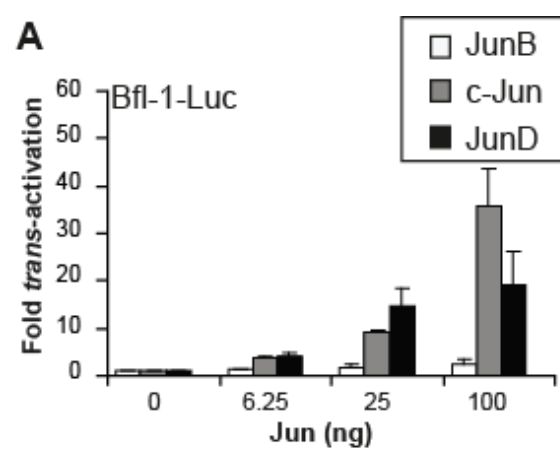
Supplementary Figure 3. **Effect of Jun members on activation of the *bfl-1* promoter.** HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μ g) and pRL-TK (0.1 μ g) plasmids with c-Jun-, JunD- or Jun-B- (6.25 to 100 ng) expression vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Figure 3. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.



Supplementary figure S1- Macaire et al.



Supplementary figure S2 - Macaire et al.



Supplementary figure S3 - Macaire et al.

3/ RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE

Les personnes ayant participé à ce travail sont :

H. Macaire¹, A. Riquet¹, M-C. Biémont-Trescol¹, M. DucDodon², R. Mahieux², J-M. Mesnard³, N. Bonnefoy-Bérard¹ et H. Valentin¹.

¹ INSERM U851, Lyon ; ² INSERM U758 ENS-Lyon, Lyon ; ³ CPBS/CNRS/UMR5236, Montpellier

3 – 1/ La protéine virale Tax de HTLV-1, mais pas HBZ, augmente l'expression de Bcl-x_L

Nous avons observé que la protéine anti-apoptotique Bfl-1 est exprimée dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, mais pas dans les lignées cellulaires T non infectées ([Figure 1 de l'article](#)). Par contre, et en accord avec les données de la littérature (*Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000*), nous avons observé une expression variable de Bcl-2 et de Bcl-x_L aussi bien dans les lignées cellulaires T non infectées que celles infectées par HTLV-1 et à la fois au niveau messager et protéique ([Figure supplémentaire 1 de l'article](#)). Des données de la littérature indiquaient que Tax activait l'expression de Bcl-x_L, mais pas de Bcl-2. Cependant, aucune donnée n'existait concernant le rôle de Bcl-x_L dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1. Dans ce contexte, nous avons étudié la régulation de l'expression de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ et son rôle dans la survie conjointement à notre étude concernant Bfl-1.

3-1-1/ La protéine virale Tax active l'expression de Bcl-x_L via la voie NF-κB

Afin de confirmer la capacité de la protéine virale Tax à activer la transcription des gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, des cellules HeLa ont été transfectées avec des vecteurs vide ou exprimant Tax. L'expression exogène de Tax et l'expression endogène des transcrits de *bcl-x_L*, *bfl-1* et *bcl-2* ont été mesurées au niveau messager par RT-PCR en temps réel (Figure 30 et figure 3 de l'article). Nos résultats montrent clairement que Tax augmente d'un facteur 2 la transcription de *bcl-x_L*, alors que Tax induit celle de *bfl-1* d'un facteur 65. Comme attendu, Tax ne module pas la transcription de *bcl-2* dans les cellules HeLa.

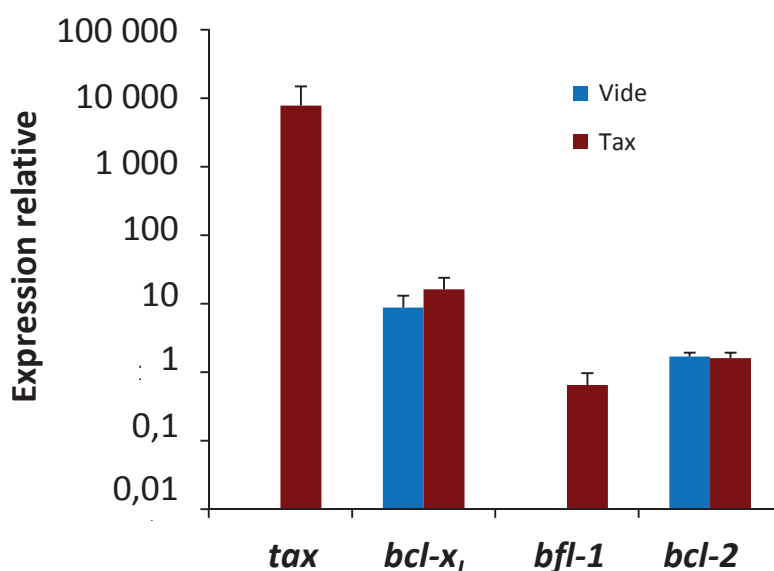


Figure 30 : Tax active la transcription de *bcl-x_L* dans les cellules HeLa

Effet de Tax sur l'expression endogène de *bcl-x_L*, *bfl-1* et *bcl-2*. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pJFE-Vide ou pJFE-Tax-WT (0,3 µg). 48h après transfection, le niveau d'expression des transcrits de *tax*, *bcl-x_L*, *bfl-1* et de *bcl-2* a été analysé par RT-PCR en temps réel et normalisé par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT. Les barres d'erreurs correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

Pour démontrer le rôle de la voie NF-κB dans la *trans*-activation du gène codant pour Bcl-x_L par Tax, nous avons traité les cellules T C91PL et MT-4 infectées par HTLV-1 avec la molécule Bay11-7082. Bay11-7082, qui est un inhibiteur de la phosphorylation des IκB, inhibe partiellement le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* dans les cellules C91PL et

MT-4 (Figure 31). Notons que le traitement des cellules C91PL et MT-4 par Bay11-7082 inhibe aussi partiellement l'expression de Bfl-1 (Figure 31).

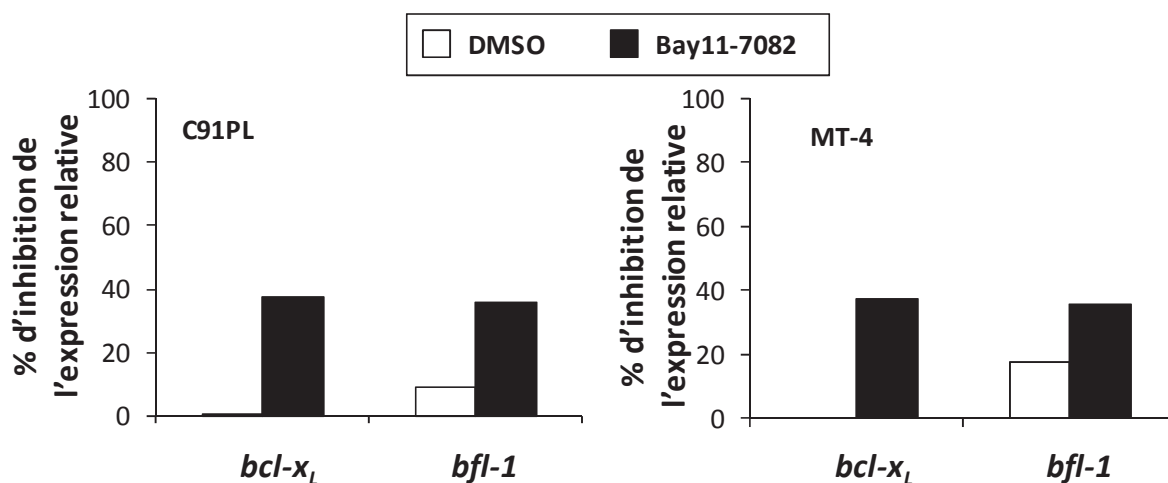


Figure 31 : La voie NF-κB classique inhibe partiellement la transcription de *bcl-x_L* et de *bfl-1* dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

Les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 ont été traitées pendant 24h avec du DMSO ou la molécule Bay11-7082 (10 μM). Le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* et de *bfl-1* a été mesuré par RT-PCR en temps réel et normalisé par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT. Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de l'expression relative par rapport à la condition non traitée. Les résultats correspondent à une expérience représentative parmi trois expériences indépendantes.

Comme Tax active la voie NF-κB classique, et que cette dernière active l'expression de Bcl-x_L dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, nous avons exploré le rôle de la voie NF-κB classique dans l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L par Tax. Nous avons observé que l'inhibiteur de la voie NF-κB classique, IκBα Dominant Négatif, réprime de moitié la transcription de *bcl-x_L* médiée par Tax dans les cellules HeLa (résultats non montrés). Ces résultats confirment que Tax active l'expression de Bcl-x_L via la voie NF-κB, comme décrit dans la littérature (Mori et al., 2001; Nicot et al., 2000). Le fait que l'inhibition de la voie NF-κB classique n'inhibe pas totalement l'expression des transcrits de *bcl-x_L* et de *bfl-1* induite par Tax suggère que d'autres facteurs de transcription sont impliqués.

3-1-2/ La protéine virale Tax coopère avec c-Jun et JunD de la famille AP-1 pour activer l'expression de Bcl-x_L

Comme nous avons montré que Tax coopère avec c-Jun et JunD pour activer la transcription du gène codant pour Bfl-1 (Figure 4 de l'article), nous avons exploré en parallèle la possibilité que Tax active l'expression de Bcl-x_L via c-Jun et JunD. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs exprimant Tax, c-Jun ou JunD seuls ou en combinaison. Le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* a été suivi par RT-PCR en temps réel (Figure 32). Alors que c-Jun n'est pas capable d'augmenter plus de deux fois la transcription de *bcl-x_L*, nous avons observé que JunD augmente le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* d'un facteur 9. Ces données suggèrent que l'homodimère de JunD, mais pas celui de c-Jun, est capable d'activer la transcription du gène codant pour Bcl-x_L. Comme pour Bfl-1, nos résultats montrent pour la première fois que Tax et c-Jun, et aussi Tax et JunD, coopèrent pour augmenter la transcription de *bcl-x_L* (Figure 32).

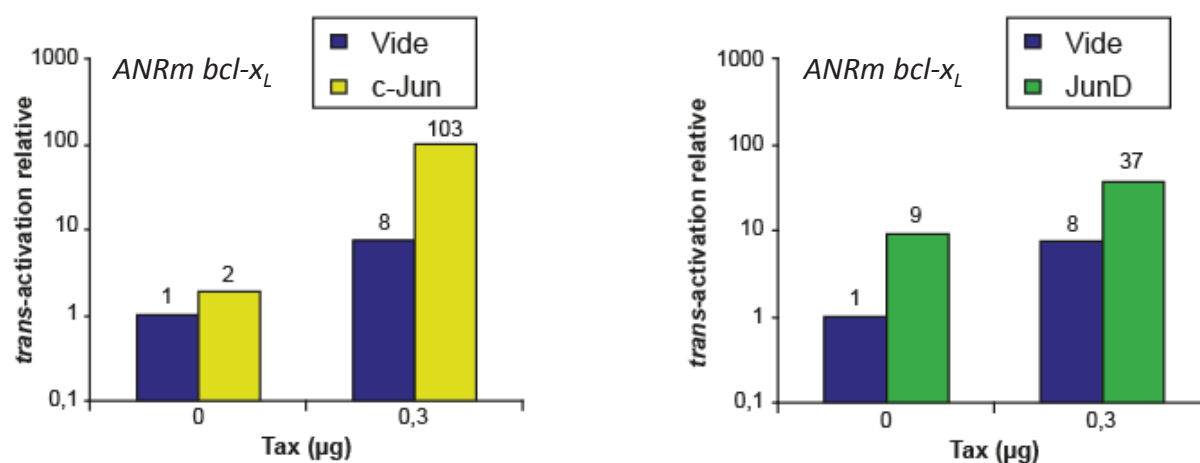


Figure 32 : La protéine virale Tax coopère avec les membres c-Jun et JunD de la famille AP-1 pour activer la transcription de *bcl-x_L*

Effet de Tax sauvage sur la transcription de *bcl-x_L* médiée par c-Jun ou JunD. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pJFE-Vide (0,3 µg), pJFE-Tax-WT (0,3 µg), pcDNA3-Vide (en quantité variable pour ajuster à 1µg total), pcDNA3-c-Jun (25 ng) ou pCMV-JunD (25 ng). 48h après transfection, la transcription du gène codant pour Bcl-x_L a été analysée par RT-PCR en temps réel et normalisée par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT, puis normalisé par rapport aux données mesurées dans les conditions de transfection avec les vecteurs vides. Les résultats sont représentatifs d'une expérience parmi deux expériences indépendantes.

3-2-3/ La protéine virale HBZ, seule ou en combinaison avec c-Jun ou JunD, n'a pas d'effet sur l'expression de Bcl-x_L

Dans l'article, nous avons montré que HBZ réprime la transcription du gène codant pour Bfl-1 médiée par c-Jun et favorise celle médiée par JunD (Figure 5 de l'article). Afin d'explorer la capacité de HBZ à activer l'expression de *bcl-x_L* via c-Jun ou JunD, des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs exprimant HBZ, c-Jun ou JunD seuls ou en combinaison. Le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* a été mesuré par RT-PCR en temps réel (Figure 33). Nos résultats montrent clairement que HBZ seule ou en combinaison avec c-Jun ou JunD n'active pas la transcription du gène codant pour Bcl-x_L. Ces données suggèrent que Bfl-1 et Bcl-x_L sont régulées de manières différentes par les protéines virales de HTLV-1 et que les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 sont plus complexes que ceux de Bcl-x_L.

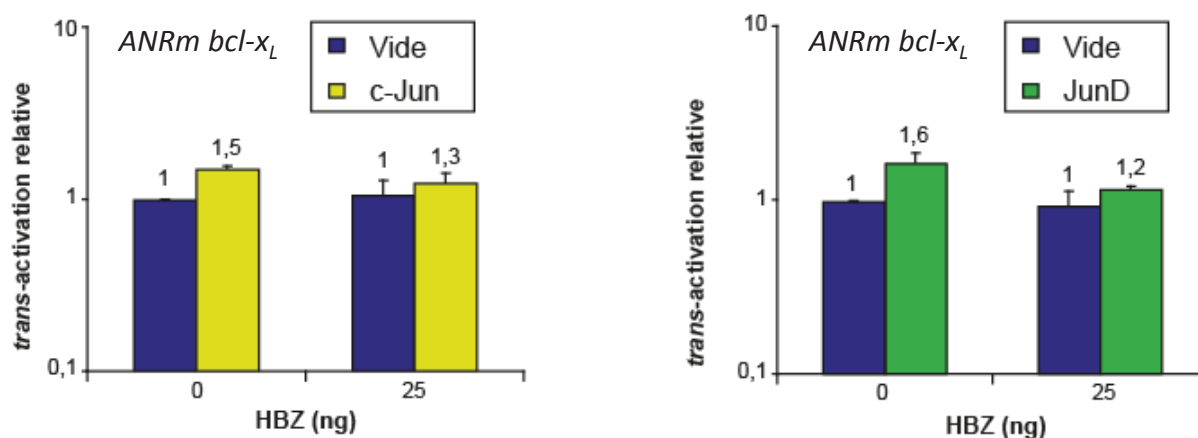


Figure 33 : La protéine virale HBZ seule ou en combinaison avec c-Jun ou JunD n'active pas l'expression de Bcl-x_L

Effet de HBZ sur la transcription de *bcl-x_L* médiée par c-Jun ou JunD. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pcDNA3-Vide (en quantité variable pour ajuster à 1µg total), pcDNA3-HBZ (25 ng), pcDNA3-c-Jun (25 ng) ou pCMV-JunD (25 ng). 48h après transfection, le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* a été analysé par RT-PCR en temps réel et normalisé par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT, puis normalisé par rapport aux données mesurées dans les conditions de transfection avec les vecteurs vides. Les barres d'erreurs correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes.

Comme HBZ module l'activité de Tax, nous avons déterminé si HBZ modulait la capacité de Tax à augmenter l'expression de Bcl-x_L. Le niveau d'expression des transcrits de *bcl-x_L* a été mesuré par RT-PCR en temps réel dans des cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ. Un fort niveau d'expression du messager de *tax* et un faible niveau de celui de *hbz* sont observés dans les cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ (Figure 34).

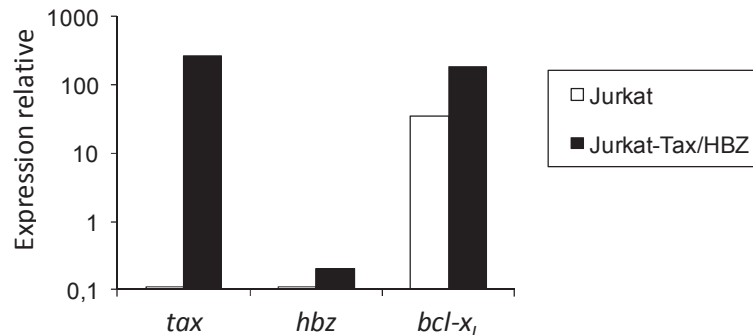


Figure 34 : Expression des transcrits de *bcl-x_L* dans des cellules Jurkat exprimant stablement les protéines virales Tax et HBZ.

Le niveau d'expression des transcrits de *tax*, *hbz* et *bcl-x_L* a été analysé par RT-PCR en temps réel dans des cellules Jurkat parentales et des cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ. Le niveau d'expression des transcrits a été normalisé par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT. Les résultats sont représentatifs d'une expérience parmi trois expériences indépendantes.

De plus, l'expression de Bfl-1 est induite d'un facteur 25 dans la lignée cellulaire T exprimant Tax et HBZ par rapport aux cellules parentales (Figure 6 de l'article), alors que celle de Bcl-x_L est augmentée d'un facteur 5 (Figure 34). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'effet de Tax sur l'expression de Bcl-x_L et de Bfl-1 est prépondérant par rapport à l'effet de HBZ.

3-2-4/ L'activité anti-apoptotique de Tax est médiée entre autres par Bfl-1 et Bcl-x_L

Comme Tax induit l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L, l'activité anti-apoptotique de Tax pourrait résulter de l'augmentation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L. Afin de confirmer l'activité anti-apoptotique de Tax, nous avons transduit les cellules T Jurkat parentales ou exprimant stablement Tax et HBZ avec des lentivirus exprimant un shARN dirigé contre Tax

ou contre la luciférase (shCtl-Luc) utilisés comme contrôle. L'efficacité de transduction a été évaluée en mesurant le nombre de cellules exprimant la GFP par cytométrie en flux. Nos résultats montrent que seulement 70 à 80% de cellules Jurkat parentales ou exprimant stablement Tax et HBZ expriment la GFP aussi bien avec le shARN dirigé contre Tax ou le shCtl-Luc (résultats non montrés). Dans les cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ, l'efficacité d'inhibition de l'expression de Tax a ensuite été mesurée par RT-PCR en temps réel 10 jours après transduction. Dans les cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ, le shARN dirigé contre Tax induit une inhibition de 80% de l'expression des transcrits du gène *tax* par comparaison aux cellules non transduites (Figure 35A). Cette expression résiduelle de Tax peut s'expliquer par le fait que 20 à 30% des cellules n'ont pas été transduites. Nous avons ensuite mesuré l'expression des transcrits *bfl-1* et *bcl-x_L* dans ces cellules par RT-PCR en temps réel. L'inhibition de l'expression de Tax corrèle avec l'inhibition de l'expression des transcrits des gènes *bfl-1* et de *bcl-x_L* (Figure 35A). Toutefois, l'inhibition de l'expression des transcrits des gènes *bfl-1* et de *bcl-x_L* ne dépasse pas 50%. L'ensemble de ces résultats peut s'expliquer par le fait que l'efficacité de transduction et donc de répression de Tax n'est pas totale. Enfin, nous avons mesuré la mort cellulaire par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. Comme attendu, l'inhibition de l'expression de Tax n'affecte pas la mortalité des cellules Jurkat parentales (Figure 35B). En revanche, l'inhibition de l'expression de Tax conduit à environ 40 % de mort des cellules Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ. Ces données suggèrent fortement que l'activité anti-apoptotique de Tax résulte de sa capacité à induire l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L (Figure 35B).

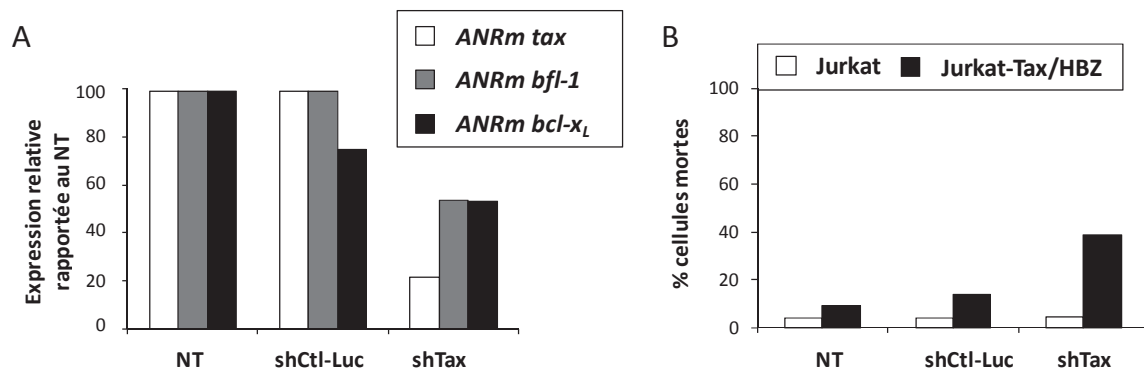


Figure 35 : L'activité anti-apoptotique de Tax est médiée entre autres par l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L

2.10⁵ cellules par ml ont été transduites avec un vecteur lentiviral exprimant un shARN contrôle (shCtl-Luc) ou dirigé contre Tax (MOI 16). (A) Le niveau d'expression des transcrits de *tax*, *bfl-1* et *bcl-x_L* a été mesuré par RT-PCR en temps réel, 10 jours après transduction. Le niveau d'expression des transcrits a été normalisé par rapport à la transcription du gène codant pour HPRT, puis normalisé par rapport à la condition non transduite. (B) Le pourcentage de cellules mortes a été mesuré après incorporation d'iodure de propidium par cytométrie en flux 10 jours après transduction. NT = non transduite.

En parallèle de l'étude du rôle de Tax sur la survie cellulaire, nous avons étudié le rôle potentiel de HBZ dans la survie des cellules T Jurkat parentales ou exprimant stablement Tax et HBZ par la technique d'ARN interférence. Nos résultats montrent clairement que l'extinction de l'expression de HBZ n'impacte pas significativement la mort spontanée des cellules Jurkat parentales ou exprimant stablement Tax et HBZ, confirmant par une autre technique que HBZ n'affecte pas la survie cellulaire (résultats non montrés).

3-2-5/ Conclusion

L'ensemble de ces travaux nous a permis de montrer que Tax active l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L via la voie NF-κB classique et coopère avec c-Jun ou JunD, favorisant ainsi la survie des cellules T exprimant Tax. En revanche, HBZ seule n'active pas l'expression de Bfl-1 ou de Bcl-x_L et module différemment l'expression de Bfl-1 induite par c-Jun ou JunD. Le fait que HBZ n'active pas significativement l'expression des protéines anti-apoptotiques peut expliquer l'incapacité de HBZ à favoriser la survie cellulaire. Il a été décrit que HBZ favorise la prolifération cellulaire. Dans des cellules T exprimant stablement Tax et HBZ, les protéines Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées, suggérant que l'effet de Tax sur l'expression des protéines

anti-apoptotiques est majoritaire par rapport à l'effet de HBZ. Par conséquent, Tax et HBZ sont des protéines complémentaires, l'une impliquée dans la survie et l'autre dans la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces données suggère fortement que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées au cours des étapes précoces et potentiellement des étapes tardives du développement de l'ATLL lorsque Tax est exprimée.

3 – 2/ Bfl-1 et/ou Bcl-x_L sont des cibles thérapeutiques potentielles pour l'ATLL

3-2-1/ Rôle des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et/ou Bcl-x_L dans la survie de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

Nous avons ensuite exploré le rôle des protéines Bfl-1 et Bcl-x_L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 par une stratégie d'ARN interférence ([Figure 7 de l'article et résultats non montrés](#)). L'ensemble des résultats obtenus sont schématisés dans la [figure 36](#). Quatre lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 sur sept sont sensibles à la fois à la mort cellulaire induite par l'extinction de l'expression de Bcl-x_L et à celle de Bfl-1 (cellules C91PL, HuT-102 et C10/MJ). Les autres lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 sont sensibles préférentiellement à la mort cellulaire induite par l'extinction de l'expression de Bcl-x_L (cellules MT-2) ou de Bfl-1 (cellules C8166-45 et MT-4). Ces résultats démontrent que Bfl-1 et/ou Bcl-x_L représentent des gènes de survie dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. La différence de sensibilité à la mort cellulaire induite par la répression de Bfl-1 ou de Bcl-x_L d'une lignée cellulaire à l'autre peut s'expliquer par le fait que les lignées cellulaires T expriment des niveaux variables de Bfl-1 et de Bcl-x_L et sont plus ou moins permissives à la transduction. Par ailleurs, aucune de ces lignées n'est sensible à l'extinction de l'expression de Bcl-2, démontrant que Bcl-2 n'est pas directement un gène de survie dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Enfin, aucune des protéines Bcl-2, Bcl-x_L ou Bfl-1 n'est impliquée dans la survie des cellules T Jurkat non infectées.

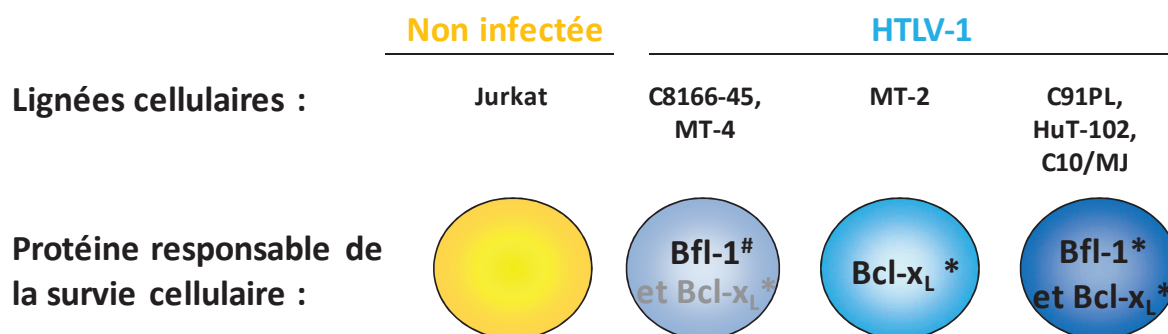


Figure 36 : Rôle de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

Schéma représentant les différents profils de sensibilité à l'extinction de l'expression de Bcl-x_L et de Bfl-1 par ARN interférence obtenus sur différentes lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1. Aucune de ces lignées n'est sensible à l'extinction de l'expression de Bcl-2 par ARN interférence. * Jusqu'à 40% de mort cellulaire induite par la transduction d'un shARN dirigé contre Bfl-1 ou contre Bcl-x_L ; # Jusqu'à 90% de mort cellulaire induite par la transduction d'un shARN dirigé contre Bfl-1.

3-2-2/ L'inhibition simultanée de Bfl-1 et de Bcl-x_L restaure complètement la mort des cellules T C91PL infectées par HTLV-1

Nous avons précédemment observé que la mort induite par l'extinction de l'expression de Bcl-x_L ou de Bfl-1 par ARN interférence ne dépassait pas 40% pour les cellules C91PL (figure 7 de l'article et figure 36). Ce résultat suggère que l'expression de Bcl-x_L compense l'absence d'expression de Bfl-1 et réciproquement, expliquant que la majorité des cellules C91PL survivent. Par conséquent, nous avons eu pour objectif de cibler simultanément Bcl-x_L et Bfl-1 pour restaurer complètement la mort des cellules C91PL.

Comme l'ABT-737 est une drogue thérapeutique ciblant spécifiquement Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, mais pas Bfl-1 ni Mcl-1, nous avons tout d'abord utilisé l'ABT-737 pour inhiber spécifiquement l'activité de Bcl-x_L. Les lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1 ont tout d'abord été traitées avec différentes concentrations d'ABT-737 pendant 48h et la mortalité a été mesurée par incorporation d'iodure de propidium. Comme attendu, l'ABT-737 n'est pas toxique pour les cellules non infectées Jurkat qui ne sont pas sensibles à l'extinction de l'expression de Bcl-x_L par ARN interférence (Figures 35 et 36). Comme l'extinction de l'expression de Bcl-x_L par ARN interférence induit autant de mort des cellules

C91PL que des cellules MT-4, nous avons traité ces deux lignées cellulaires avec l'ABT-737. L'ABT-737 induit la mortalité de ces cellules de manière dose-dépendante jusqu'à 1 250 μ M (Figure 37 et résultats non montrés). Par conséquent, une bonne corrélation est observée entre la sensibilité des lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1 à la mort induite suite à l'extinction de l'expression de Bcl-x_L par shARN et à celle induite suite à l'inhibition de l'activité de Bcl-x_L par l'ABT-737.

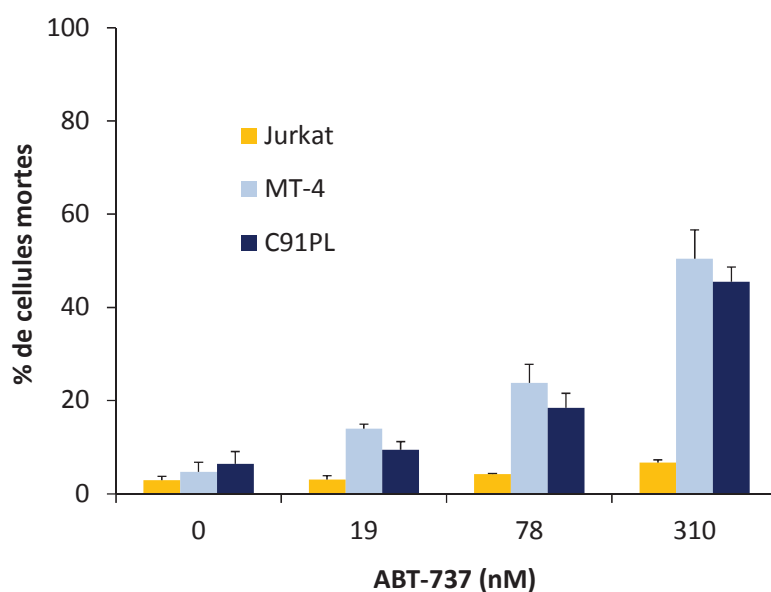


Figure 37 : Effet de l'ABT-737 sur la mortalité des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

Les lignées T Jurkat (non infectée), C91PL et MT-4 (infectées par HTLV-1) ($2 \cdot 10^5$ cellules par ml) ont été traitées avec des doses croissantes d'ABT-737 pendant 48h et la mortalité a été mesurée par incorporation d'iodure de propidium. Les barres d'erreurs correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes.

Comme Bfl-1 et Bcl-x_L sont impliquées dans la survie des cellules C91PL et qu'il n'existe pas de molécule ciblant Bfl-1, nous avons ensuite inhibé simultanément l'activité de Bcl-x_L par l'ABT-737 et l'expression de Bfl-1 par ARN interférence. Les cellules Jurkat ou C91PL ont été transduites avec un lentivirus exprimant un shARN contrôle dirigé contre une séquence aléatoire ou un shARN dirigé contre Bfl-1. 5 jours après transduction, les cellules transduites ont été traitées avec des doses croissantes d'ABT-737. 48h après traitement, la mortalité cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. L'efficacité de transduction et de l'extinction de l'expression protéique ont été

validées comme décrit dans l'article (résultats non montrés). Comme présenté dans la [figure 37](#), l'ABT-737 induit la mort des cellules C91PL de manière dose-dépendante. De même, nous retrouvons près de 40% de mort cellulaire lorsque les cellules sont transduites avec un lentivirus exprimant un shARN dirigé contre Bfl-1, comme dans la figure 7 de l'article. De manière intéressante, la combinaison de l'ABT-737 à 78 nM et du shARN dirigé contre Bfl-1 induit jusqu'à 69% de mortalité des cellules C91PL, alors que l'ABT-737 seul à 78 nM et le shARN dirigé contre Bfl-1 seul n'induisent respectivement que 18% et 37% de mort des cellules C91PL. Ainsi, l'inhibition simultanée de l'activité de Bcl-x_L et de l'expression de Bfl-1 restaure la mort des cellules C91PL. De plus, l'inhibition de l'expression de Bfl-1 par shARN sensibilise les cellules C91PL à la mort induite par l'ABT-737 dès 19 nM ([Figure 38](#)). Par conséquent, le fait d'inhiber l'expression de Bfl-1 permet de réduire les doses d'ABT-737 pour induire un même niveau de mort cellulaire. Nos résultats montrent donc clairement que Bfl-1 et Bcl-x_L coopèrent pour favoriser la survie des cellules T C91PL infectées par HTLV-1. Le même type d'expérience a également été réalisé avec les cellules MT-4. Cependant, la forte mortalité due au shARN dirigé contre Bfl-1 seul (environ 90%) ne permet pas de visualiser un effet coopératif avec l'ABT-737 (résultats non montrés).

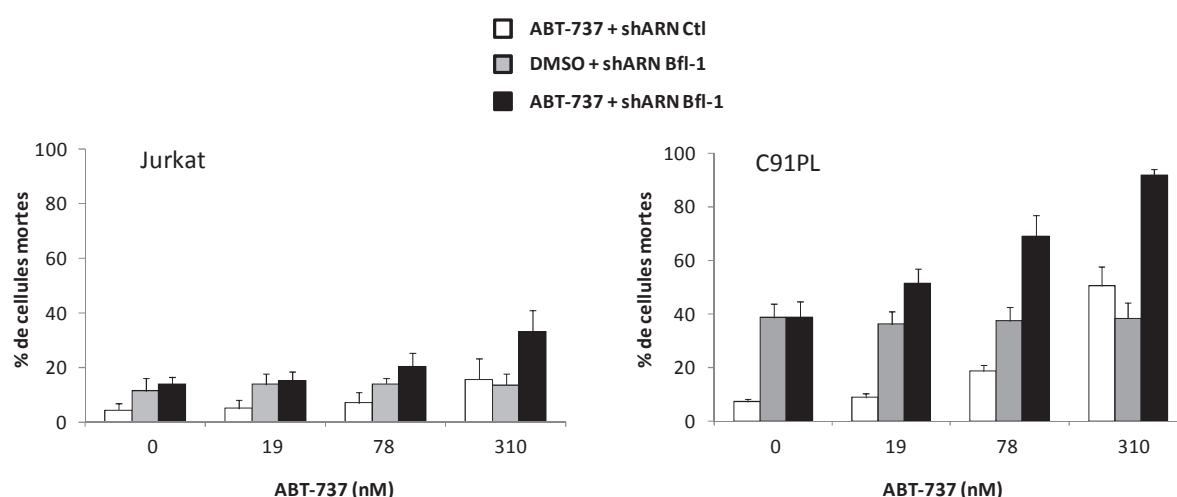


Figure 38 : Bfl-1 et Bcl-x_L coopèrent pour induire la survie des cellules C91PL

Effet combiné de l'ABT-737 et du shARN dirigé contre Bfl-1 sur la mortalité des cellules Jurkat et des cellules C91PL. 2.10⁵ cellules par ml ont été transduites avec un vecteur lentiviral exprimant un shARN contrôle (Ctl) ou dirigé contre Bfl-1 (MOI 16). 5 jours après transduction, les cellules ont été traitées avec des doses croissantes d'ABT-737 et la mortalité a été mesurée 48h après traitement par incorporation d'iodure de propidium. Les barres d'erreurs sont établies à partir de trois expériences indépendantes.

Les cellules Jurkat, utilisées comme contrôle, ne sont pas sensibles à la mort induite par l'ABT-737 ou par le shARN dirigé contre Bfl-1. Toutefois, le traitement de l'ABT-737 des cellules Jurkat transduites avec un lentivirus exprimant un shARN dirigé contre Bfl-1 conduit à une légère toxicité à la dose la plus forte d'ABT-737 (Figure 38).

L'ensemble de nos résultats montre que Bfl-1 et Bcl-x_L jouent un rôle dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1. De plus, l'inhibition simultanée de Bfl-1 et de Bcl-x_L est nécessaire pour restaurer la mort des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Par conséquent, l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L induite par HTLV-1 présenterait un mécanisme de survie des cellules T infectées, en particulier dans les cellules d'ATLL lorsque Tax est exprimée. Enfin, ces résultats suggèrent que Bfl-1 et Bcl-x_L représentent des cibles thérapeutiques potentielles dans les cas d'ATLL pour lesquels Tax est exprimée.

2^{EME} PARTIE : RESULTATS SUR LES PETITES MOLECULES A VISEE THERAPEUTIQUE :

Identification et caractérisation de petites molécules dirigées contre la protéine anti-apoptotique Bfl-1

Les personnes ayant participé à ce travail sont :

H. Macaire^{1, 2}, A-L. Debaud¹, C. Bardou², J. Denis², J. Pansanel², M-L. Fogeron¹, B. Villoutreix³, H. Valentin¹ et N. Bonnefoy-Bérard¹.

¹INSERM U851, Lyon; ²IMAXIO, Lyon; ³INSERM UMR-S 973, Paris

1/ INTRODUCTION

Une surexpression du membre anti-apoptotique Bfl-1 est observée en particulier dans des hémopathies B où Bfl-1 a été reconnue comme gène signature (*Feuerhake et al., 2005; Mahadevan et al., 2005; Monti et al., 2005; Morales et al., 2005; Olsson et al., 2007*). Au sein du laboratoire, nous avons précédemment montré que Bfl-1 est impliquée dans la survie des lignées humaines lymphoblastoïdes type B et des lignées humaines de leucémies/lymphomes de type T infectées par HTLV-1 (*Brien et al., 2007*) et Macaire et al., en préparation). **L'ensemble de ces données suggère que Bfl-1 est une cible thérapeutique potentielle dans les leucémies/lymphomes de type B et T viro-induites.**

Comme indiqué dans l'introduction de cette thèse, de nombreuses molécules ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été développées. Certaines, comme l'acide gambogique, ciblent l'ensemble des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*Zhai et al., 2008a*). Toutefois, leur capacité à lier plusieurs protéines anti-apoptotiques corrèle généralement avec une faible affinité pour chacune d'entre elles. Au contraire, les molécules à spectre restreint sont plus spécifiques et possèdent souvent une meilleure affinité pour leur(s) cible(s), ce qui les prédestinent à être de bons candidats thérapeutiques. En particulier, l'ABT-737, actuellement en essai clinique sous la forme orale ABT-263,

possède une forte affinité pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, et une très faible affinité pour Bfl-1 et Mcl-1 (*Oltersdorf et al., 2005; Tse et al., 2008*). Toutefois, le traitement de lignées de lymphomes B par l'ABT-737 induit une surexpression de Bfl-1 et de Mcl-1 (*Yecies et al., 2010*). Cette surexpression des membres anti-apoptotiques, non ciblés par l'ABT-737, est responsable de la résistance à l'apoptose induite par l'ABT-737 et, par conséquent, conduit à la chimiorésistance (*Yecies et al., 2010*). Aussi, une molécule spécifique de Bfl-1 pourrait être utilisée pour traiter les patients résistants à l'ABT-737 ou encore pour traiter d'autres pathologies pour lesquelles Bfl-1 est une cible thérapeutique. Par conséquent, identifier une telle molécule semble aujourd'hui indispensable pour permettre une thérapie ciblée plus efficace des leucémies/lymphomes de type T et B pour lesquels Bfl-1 joue un rôle essentiel dans la survie et/ou la chimiorésistance.

Dans certaines cellules cancéreuses, une surexpression de Bfl-1 contraint la cellule à survivre même lors d'un signal apoptotique naturel ou thérapeutique ([Figure 39A](#)). Dans le but d'identifier des inhibiteurs spécifiques de Bfl-1, l'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard a précédemment développé la stratégie des aptamères peptidiques ([Figure 39B](#)). Deux aptamères peptidiques, Apt50 et Apt27, capables de se lier à Bfl-1 et de sensibiliser une lignée leucémique B à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques conventionnels, ont alors été isolés (*Brien et al., 2011*). Comme les aptamères peptidiques ne peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques, nous avons choisi d'utiliser ces aptamères comme outils pour identifier des petites molécules à visée thérapeutique. En collaboration avec la société IMAXIO (Lyon), nous avons utilisé la technologie Aptascreen® pour identifier des molécules capables de rompre l'interaction entre Bfl-1 et ses ligands pour restaurer l'apoptose ([Figure 39C](#)).

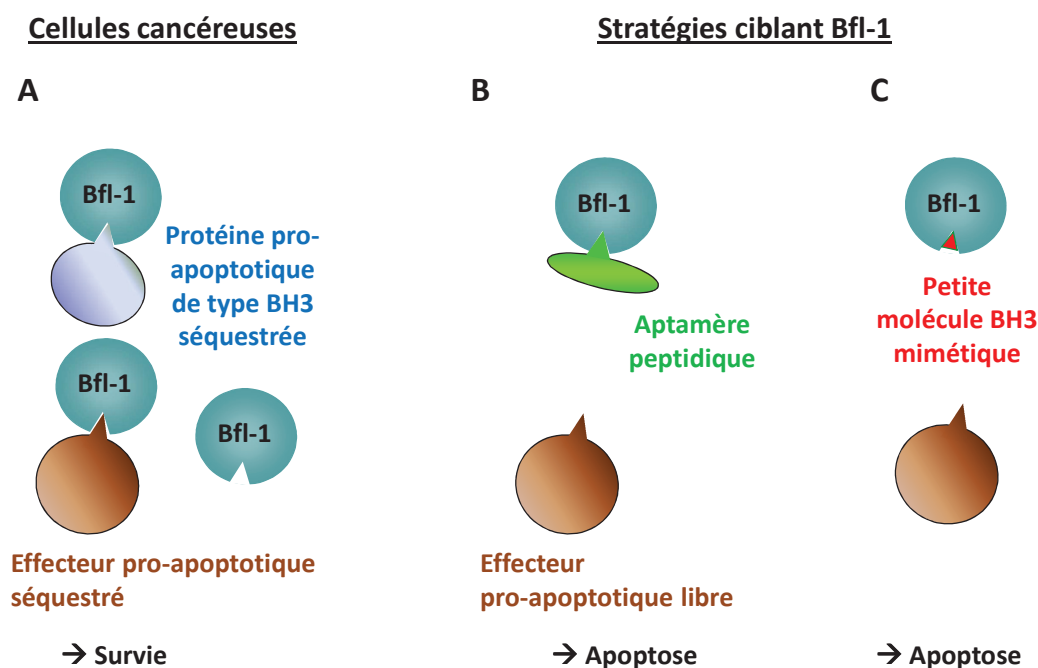


Figure 39 : Stratégies thérapeutiques ciblant Bfl-1

(A) Dans les cellules cancéreuses, une surexpression de Bfl-1 contraint les cellules à survivre en séquestrant les membres pro-apoptotiques quel que soit l'environnement cellulaire. (B, C) Stratégies ciblant Bfl-1 développées par le laboratoire. Des aptamères peptidiques capables de lier la poche hydrophobe de Bfl-1 ont été identifiés et ont servi à l'identification de petites molécules spécifiques de Bfl-1.

L'AptaScreen® est une technologie innovante qui a été développée dans le but d'identifier des petites molécules capables de rompre les interactions protéine-protéine. L'AptaScreen® est un crible haut débit utilisant le système double hybride chez la levure. Dans ce système, les levures expriment une protéine, dite appât, fusionnée au domaine d'activation (DA) d'un facteur de transcription et son ligand, dit proie, fusionné au domaine de liaison à l'ADN (DL) du même facteur de transcription (Figure 40A). Pour l'identification de petites molécules dirigées contre Bfl-1, la protéine Bfl-1 a été utilisée en tant qu'appât, et l'aptamère peptidique spécifique de Bfl-1, Apt50, et le ligand naturel Bim ont été utilisés en tant que proie (ligand). L'interaction entre la protéine et son ligand permet la reconstitution du facteur de transcription et l'expression d'un gène rapporteur. Dans notre cas, c'est le gène codant pour la luciférase. L'interaction protéine-ligand est ainsi révélée par un test luciférase classique (Figure 40B). **Par conséquent, une petite molécule capable de rompre l'interaction protéine-ligand inhibe l'expression de la luciférase et une baisse de la luminescence est mesurée (Figure 40C).** En revanche, aucune diminution de la luminescence

n'est observée dans le cas d'une petite molécule incapable de dissocier l'interaction protéine-ligand (Figure 40D).

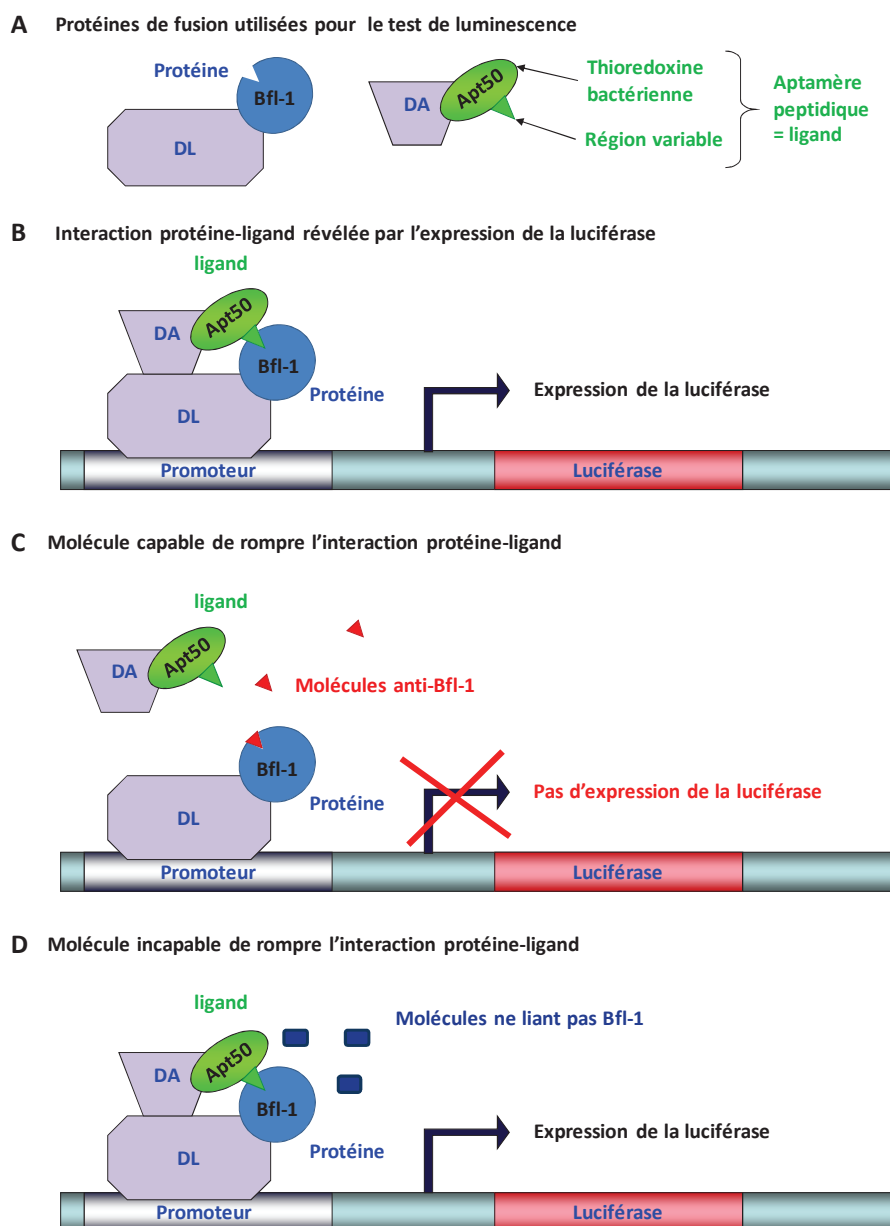


Figure 40 : Principe du test de luminescence double hybride chez la levure, illustration de l'interaction protéine-ligand Bfl-1/Apt50

(A) Représentation schématique de l'aptamère peptidique Apt50 fusionné au domaine d'activation (DA) d'un facteur de transcription et de Bfl-1 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DL) du même facteur de transcription. (B) La liaison entre Bfl-1 et Apt50 permet la reconstitution du facteur de transcription, la liaison de ce complexe protéique sur le promoteur puis l'activation du gène codant pour la luciférase. (C) Lorsqu'une molécule (triangle rouge) est capable de rompre l'interaction Bfl-1/Apt50, le facteur de transcription n'est pas reconstitué et la luciférase n'est pas exprimée. (D) Lorsqu'une molécule (rectangle bleue) n'est pas capable de rompre l'interaction Bfl-1/Apt50, aucune variation de l'expression de la luciférase n'est observée par comparaison aux conditions sans molécule (A).

En parallèle de l'interaction Bfl-1/Apt50, la technologie AptaScreen® utilise une autre interaction protéine-protéine aux caractéristiques très éloignées de notre interaction d'intérêt Bfl-1/Apt50. Cette interaction, dite interaction contrôle, est utilisée pour confirmer la spécificité des molécules vis-à-vis de l'interaction Bfl-1/Apt50. Les partenaires de cette interaction contrôle ont été appelés appât-contrôle (appât-Ctl) et proie-contrôle (proie-Ctl) dans le cadre de notre projet. De plus, l'AptaScreen exploite deux types de rapporteurs luciférase, la luciférase de luciole (Luc) et la luciférase de *renilla reniformis* (pensée de mer, sorte d'anémone) (Ruc), permettant de différencier la luminescence induite par l'interaction Bfl-1/Apt50 de celle induite par l'interaction contrôle. Pour le crible de petites molécules dirigées contre Bfl-1, les deux interactions Bfl-1/Apt50 et appât-contrôle/proie-contrôle ayant pour gène rapporteur respectifs la luciférase Ruc et Luc ont été étudiées. Deux lectures de luminescence séquentielles permettent d'analyser l'effet des molécules sur les deux interactions appât-proie étudiées (Figure 41). **Une petite molécule capable de rompre spécifiquement l'interaction Bfl-1/Apt50 inhibe la luminescence Ruc, mais pas Luc. Cette petite molécule est retenue comme candidat potentiel** (Figure 41 scénario 1). A l'inverse, une molécule n'ayant pas d'effet sur les deux interactions étudiées ne module pas l'expression des luciférase Luc et Ruc (Figure 41 scénario 2). Cependant, comme les molécules candidats potentiels, les molécules toxiques ou aspécifiques induisent une inhibition de la luminescence (Figure 41 comparer les levures exprimant l'interaction Bfl-1/Apt50 en vert dans les scénarii 1 et 3). L'étude de l'interaction contrôle permet de repérer les molécules toxiques et/ou aspécifiques puisque ces dernières inhibent à la fois la luminescence Luc et Ruc. (Figure 41 comparer les scénarii 1 et 3). Par conséquent, seules les molécules capables d'inhiber la luminescence Ruc, et pas Luc, seront retenues (Figure 41 scénario 1). A l'inverse, l'interaction Bfl-1/Apt50 peut servir de contrôle à l'interaction appât-contrôle/proie-contrôle. Ainsi, l'utilisation de cette double luminescence permet de cribler simultanément les molécules sur deux interactions différentes et est un avantage majeur en termes de temps et de coût. En effet, deux projets sont réalisés simultanément permettant de réduire les quantités de molécules et de réactifs utilisées.

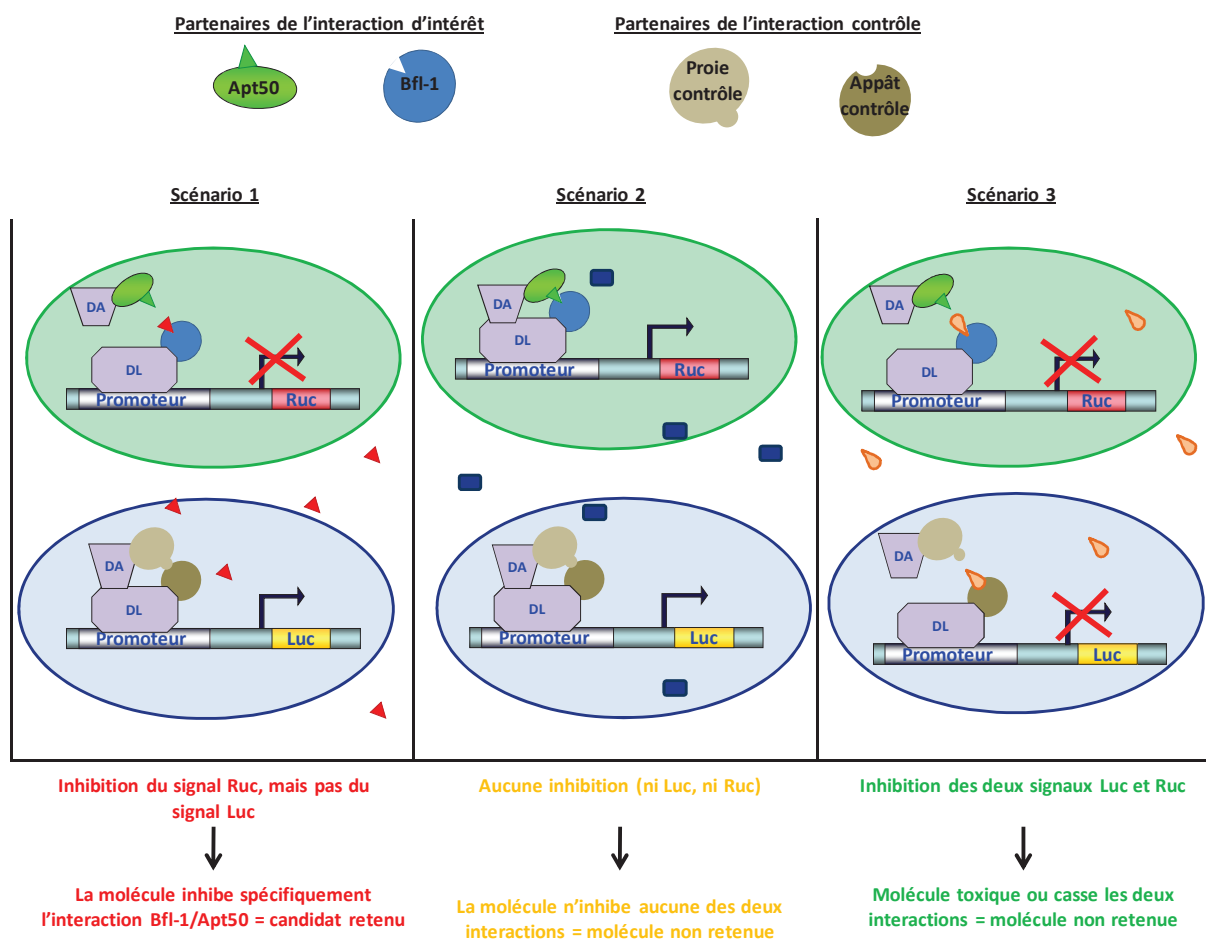


Figure 41 : Principe du crible haut débit de petites molécules de double luminescence en double hybride chez la levure

3 des scénarii possibles sont représentés. Chaque scénario, correspondant à 1 puits d'une plaque de criblage, contient un mélange de levures : les unes exprimant l'interaction Bfl-1/Apt50-Ruc (vert) et les autres exprimant l'interaction appât-Ctl/proie-Ctl-Luc (bleu). **Scénario 1** : la molécule inhibe l'interaction Bfl-1/Apt50, mais pas l'interaction contrôle. Cela se traduit par l'inhibition de la luminescence Ruc, mais pas Luc. **Scénario 2** : la molécule n'a pas d'effet sur les deux interactions protéine-protéine. Par conséquent, les levures émettent des signaux de luminescence Luc et Ruc. **Scénario 3** : la molécule est non spécifique (rompt les deux interactions indifféremment) ou toxique (cause la mort des levures). Par conséquent, aucun signal de luminescence n'est observé. Seules les molécules correspondant au scénario 1 sont retenues à l'issue du crible car elles rompent spécifiquement l'interaction Bfl-1/Apt50 (D'après (Bardou et al., 2009)).

Un autre avantage de cette technique repose sur l'utilisation d'un système d'expression inducible de la proie. En effet, l'expression de la proie (Apt50 ou proie-contrôle) est inducible par le galactose tandis que celle de l'appât (Bfl-1 ou appât-contrôle) est constitutive. L'ajout de galactose en même temps que les molécules permet à ces dernières de se lier à l'appât avant que la proie soit exprimée. Par conséquent, les molécules

dont l'affinité ne serait pas assez forte pour rompre l'interaction protéine-ligand, mais suffisante pour empêcher cette interaction (fixation au préalable), sont sélectionnées. Le niveau de sensibilité de la méthode permet donc de sélectionner des molécules d'affinité moyenne qui restent potentiellement intéressantes pour l'étude de groupements actifs capables de se lier à Bfl-1.

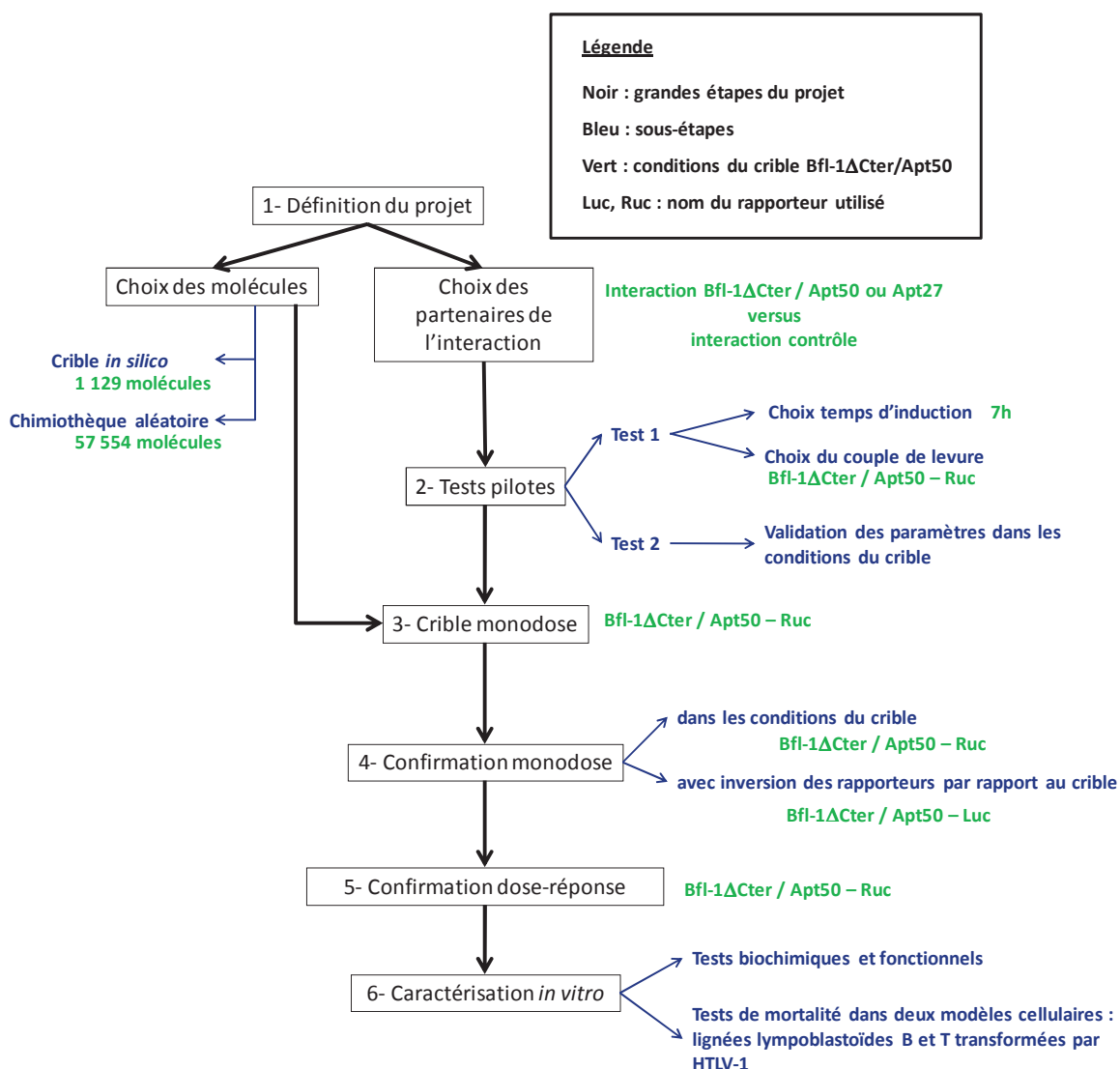
Comme tout crible haut débit, les résultats concernant certaines molécules ne reflètent pas leur capacité réelle à rompre l'interaction protéine-protéine. C'est le cas des faux positifs et des faux négatifs. Les faux positifs sont des molécules capables d'inhiber la luminescence, mais incapables de rompre l'interaction protéine-protéine correspondante, comme des molécules toxiques ou aspécifiques (Figure 41 scénario 3). Le fait d'utiliser deux interactions indépendantes en parallèle permet d'éliminer la majorité des faux positifs. En revanche, les faux négatifs sont plus difficiles à déceler. Par exemple, une molécule incapable de pénétrer dans la levure ne peut pas rompre l'interaction protéine-protéine cible. Cet effet est limité par l'utilisation d'une souche de levures mutée pour augmenter la perméabilité de leur paroi et de DMSO, solvant très perméabilisant, facilitant l'entrée des molécules dans les levures.

Les molécules à visée thérapeutique dirigées contre Bfl-1 ont été isolées pour leur capacité à empêcher l'interaction Bfl-1/Apt50 ou l'interaction Bfl-1/Bim par la technologie Aptascreen®. Les molécules ont ensuite été caractérisées dans des tests *in vitro*. La figure 42A présente le diagramme des processus de ce projet dont la première étape consiste à définir les molécules qui seront testées et les partenaires de l'interaction (Figure 42A, étape 1). Au total, 58 683 petites molécules ont été choisies de deux manières différentes. 57 554 molécules, issues de quatre chimiothèques commerciales, ont été sélectionnées au hasard parmi les molécules disponibles chez chacun des fournisseurs. En parallèle, un crible *in silico* de 500 000 molécules capables de se lier au niveau de la poche hydrophobe de Bfl-1 a été réalisé (collaboration avec B. Villoutreix, Paris). Par des modélisations chemo-informatiques, ce crible a permis de pronostiquer 1 129 molécules. Cette étude a été réalisée à partir de la structure cristalline de Bfl-1 dépourvue du domaine C-terminal (code

PDB : 2VM6) (Herman *et al.*, 2008). Cette structure a été obtenue à partir d'un complexe Bfl-1 Δ Cter/Bim-BH3 (domaine BH3 de Bim).

En parallèle, les proies et appâts des interactions contrôles et d'intérêt ont été définis. Classiquement, deux proies pour le même l'appât sont étudiées. En effet, les tests pilotes, facilement réalisables, permettent de tester deux interactions appât-proie1 et appât-proie2, offrant ainsi plus de possibilités dans le choix des conditions à utiliser pour le crible. Aussi, les tests pilotes ont été réalisés sur les interactions Bfl-1/Apt27 et Bfl-1/Apt50. Par ailleurs, étant donné que le crible *in silico* a été réalisé sur une structure de Bfl-1 issue d'un complexe Bfl-1/Bim-BH3, il semblait particulièrement intéressant d'étudier la capacité de ces molécules à rompre l'interaction Bfl-1/Bim (Figure 42B). Ainsi, trois proies, Apt27, Apt50 et Bim ont été utilisées pour l'identification de petites molécules anti-Bfl-1. De même, deux aptamères peptidiques (proie-Ctl1 et proie-Ctl2) spécifiques de l'appât-contrôle ont été étudiés.

Il est connu que la partie C-terminale de Bfl-1 permet la localisation membranaire de Bfl-1 et se replie dans la poche hydrophobe si la protéine n'est pas ancrée dans une membrane. Pour favoriser la localisation nucléaire de Bfl-1 dans la levure et l'accès des molécules à la poche hydrophobe, nous avons utilisé une construction de Bfl-1 dépourvue de la partie C-terminale (Bfl-1 Δ Cter).

A Diagramme des processus : exemple du crible sur l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50**B** Cribles réalisés pour l'identification des molécules anti-Bfl-1

Interaction étudiée	Bfl-1/Apt50	Bfl-1/Bim
Chimiothèque		
Enrichie (par un crible <i>in silico</i>)		
Aléatoire		

Figure 42 : Organisation du projet visant à identifier des molécules dirigées contre Bfl-1

(A) Diagramme des processus du crible de petites molécules dirigées contre Bfl-1 : cas du crible sur l'interaction Bfl-1/Apt50. Grandes étapes du projet (encadrés noirs) et leurs sous-étapes (bleues). Vert : illustration pour les conditions utilisées pour l'identification des molécules dirigées contre Bfl-1. Bfl-1ΔCter/Apt50-Ruc : interaction Bfl-1/Atp50 révélée par la luminescence Ruc. Bfl-1ΔCter/Apt50-Luc : interaction Bfl-1/Atp50 révélée par la luminescence Luc. **(B)** Présentation des deux cribles réalisés pour l'identification des molécules anti-Bfl-1. Vert = crible réalisé, X = crible non réalisé.

Des tests pilotes permettant d'étudier un grand nombre de conditions ont été réalisés afin de s'assurer de la faisabilité du crible monodose et de l'optimiser. Ils ont permis de sélectionner l'interaction Bfl-1/Apt50 révélée par la luciférase Ruc pour le crible monodose (Figure 42A, étape 2 et chapitre 2-1-2). Le crible a ensuite été effectué à une concentration fixe et identique pour chaque molécule (crible monodose) (Figure 42A, étape 3 et chapitre 2-1-3). Les résultats du crible ont ensuite été confirmés par deux tests de confirmation monodose (Figure 42A, étape 4 et chapitre 2-1-4). Le premier confirme les résultats obtenus dans les conditions du crible (interaction Bfl-1/Apt50 révélée par la luciférase Ruc). Le deuxième élimine les molécules capables d'interférer avec la réaction de la luciférase. En effet, une molécule organique peut interférer avec la réaction luciférase Luc ou la réaction luciférase Ruc et ainsi amplifier (faux négatif) ou inhiber (faux positif) le signal luminescent. Pour s'affranchir de cet effet, un deuxième test de confirmation monodose dit « avec inversion des rapporteurs » permet d'analyser l'effet des molécules sur l'interaction Bfl-1/Apt50 révélée par la luciférase Luc. Ainsi, les molécules ayant une activité sous les deux configurations Luc et Ruc ont été sélectionnées (Figure 42A, étape 4 et chapitre 2-1-4). Toutefois, en tenant compte de la spécificité des molécules, de leur caractère physico-chimique et de la reproductibilité des expériences, certaines molécules peuvent être sélectionnées malgré une activité sous la configuration Luc ou Ruc uniquement. Enfin, un test de confirmation en dose-réponse a été réalisé pour obtenir un profil d'inhibition de chaque molécule contre l'interaction Bfl-1/Apt50-Ruc (Figure 42A, étape 5 et chapitre 2-1-5). L'ensemble de ces cinq étapes a été réalisé au sein de la société Imaxio. Les molécules retenues par la technique Aptascreen® ont ensuite été caractérisées au laboratoire Inserm par des tests biochimiques et fonctionnels. Leur capacité à provoquer la mort cellulaire a aussi été validée dans des modèles cellulaires pour lesquelles Bfl-1 est responsable de la survie (lignées humaines lymphoblastoïdes B ou T transformées par HTLV-1) (Figure 42A, étape 6 et chapitre 2-3 et 2-4).

2/ RESULTATS

Cette partie reprend chacune des étapes définies dans la [figure 42](#). Les étapes 2 à 5 concernant le crible Aptascreen® proprement dit sont illustrées dans cette partie résultats par le crible de petites molécules sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50. Puis, un bilan du crible de petites molécules réalisé sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim sera présenté ainsi que les tests de caractérisation biochimique et fonctionnels *in vitro* ([Figure 42A, étape 6](#)). Enfin, les résultats portant sur l'étude de quelques molécules dans le modèle de lignées lymphoblastoïdes T infectées par HTLV-1 seront présentés ([Figure 42A, étape 6](#)).

2 – 1/ Identification de petites molécules capables de rompre l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 par un crible haut débit en double hybride chez la levure

Pour des raisons de clarté, seuls les résultats concernant les interactions Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et appât-contrôle/proie-contrôle finalement retenues pour le crible monodose à l'issue des résultats des tests pilotes sont présentés dans ce chapitre. Les résultats des tests pilotes ont permis de choisir Apt50 par rapport à Apt27 pour le crible de petites molécules dirigées contre Bfl-1.

2-1-1/ Tests pilotes

Les levures ont été transformées avec une combinaison de trois plasmides : un plasmide codant pour la proie, un plasmide codant pour l'appât et un plasmide codant pour le gène rapporteur. Ainsi, des levures transformées avec les combinaisons Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Luc, Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Ruc, appât-Ctl/proie-Ctl-Luc et appât-Ctl/proie-Ctl-Ruc ont été obtenues. En vue de l'analyse du crible monodose, qui compare des valeurs de luminescence Luc et Ruc ([Figure 41](#)), un couple de combinaison, l'une correspondant à Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et l'autre à appât-Ctl/proie-Ctl a été déterminé par les tests pilotes. Afin de comparer les

signaux Luc et Ruc, les levures transformées avec ces combinaisons doivent émettre des signaux du même ordre de grandeur.

Pour équilibrer les valeurs des luminescences Luc et Ruc, il est possible de faire varier le nombre de copies des plasmides codant pour les protéines étudiées en utilisant des origines de réplication du plasmide différentes (grand ou faible nombre de copies). En effet, si le plasmide possède une origine de réplication de type grand nombre de copies, la levure possèdera un grand nombre de copies du plasmide exprimant le gène d'intérêt qui sera alors exprimé en plus grande quantité.

Sachant que cinq proies (Apt50, Apt27, Bim, proie-Ctl1 et proie-Ctl2) et deux appâts (Bfl-1 et appât-Ctl) ont été choisis et qu'il existe deux types de plasmides codant pour la proie ou l'appât (grand ou faible nombre de copie) et deux types de plasmides codant pour le gène rapporteur de la luciférase (Luc ou Ruc), le nombre de combinaison des trois plasmides est multiplié. En effet, après transformation, 40 cultures de levures correspondant à 40 combinaisons ont été obtenues et utilisées dans les tests pilotes. Une partie de ces combinaisons est présentée dans le [tableau – 3](#). Les levures exprimant l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 correspondent aux combinaisons 1 à 8 et celle exprimant l'interaction contrôle correspondent aux combinaisons Ctl1 à Ctl8 ([Tableau – 3](#)).

Tableau – 3 : Combinaisons de trois plasmides présentées dans les Figures 5, 6 et 7

Combinaisons	Appât	Nombre de copies du plasmide « appât »	proie	Nombre de copies du plasmide « proie »	Type de luciférase
Combinaison 1	Bfl-1	+++	Apt50	+++	Luc
Combinaison 2	Bfl-1	+	Apt50	+++	Luc
Combinaison 3	Bfl-1	+++	Apt50	+	Luc
Combinaison 4	Bfl-1	+	Apt50	+	Luc
Combinaison 5	Bfl-1	+++	Apt50	+++	Ruc
Combinaison 6	Bfl-1	+	Apt50	+++	Ruc
Combinaison 7	Bfl-1	+++	Apt50	+	Ruc
Combinaison 8	Bfl-1	+	Apt50	+	Ruc
Combinaison Ctl1	appât Ctl	+++	proie Ctl	+++	Luc
Combinaison Ctl2	appât Ctl	+	proie Ctl	+++	Luc
Combinaison Ctl3	appât Ctl	+++	proie Ctl	+	Luc
Combinaison Ctl4	appât Ctl	+	proie Ctl	+	Luc
Combinaison Ctl5	appât Ctl	+++	proie Ctl	+++	Ruc
Combinaison Ctl6	appât Ctl	+	proie Ctl	+++	Ruc
Combinaison Ctl7	appât Ctl	+++	proie Ctl	+	Ruc
Combinaison Ctl8	appât Ctl	+	proie Ctl	+	Ruc

(+++): plasmide ayant une origine de réplication à grand nombre de copies (2 μ), (+): plasmide ayant une origine de réplication à faible nombre de copies (CEN/ARS). Les levures ont été transformées avec une combinaison d'un plasmide permettant l'expression de l'appât (plasmide « appât »), d'un plasmide permettant l'expression de la proie (plasmide « proie ») et d'un plasmide permettant l'expression de la luciférase Luc ou Ruc. Fond bleu, les combinaisons utilisées pour le crible monodose et la confirmation dans les conditions du crible (chapitres 2-1-2 et 2-1-3). Fond vert, les combinaisons utilisées pour la confirmation monodose avec inversion des rapporteurs (chapitre 2-1-4).

L'objectif des tests pilotes est de déterminer, par des essais simples et manuels, un couple de combinaison (une combinaison correspondant à l'interaction d'intérêt et l'autre à l'interaction contrôle). De plus, ces tests pilotes permettent d'évaluer le temps d'induction de l'expression de la proie nécessaire à l'obtention de signaux luminescents d'un même ordre de grandeur.

2-1-1a/ Test 1 : choix du couple de levures et du temps d'induction

L'objectif de ce premier test pilote incluant deux essais indépendants, est de choisir un ou plusieurs couples de combinaison. Deux types de couples de combinaison sont possibles : une combinaison Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Luc + une combinaison appât-Ctl/proie-Ctl-Ruc ou une combinaison Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Ruc + une combinaison appât-Ctl/proie-Ctl-Luc.

Le premier essai, correspondant à une cinétique d'induction de la luminescence suite à l'induction de l'expression de la proie par le galactose, a permis d'évaluer le phénotype des levures transformées avec chacune des 40 combinaisons. Le bruit de fond de luminescence dû à l'auto-activation de l'expression de la luciférase et le temps d'induction nécessaire à l'obtention d'un signal luminescent compatible avec le crible monodose ont alors été évalués. Après transformation, les levures ont été cultivées en présence de DMSO et de galactose entre 1h et 7h. Comme les molécules utilisées dans les étapes 3 à 5 (Figure 43) étaient diluées dans du DMSO, il était nécessaire d'évaluer dès les tests pilotes les signaux de luminescence en présence de DMSO seul. Uniquement les résultats concernant les levures transformées avec les combinaisons 1 à 8, correspondant à l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50, sont présentés (Figure 43).

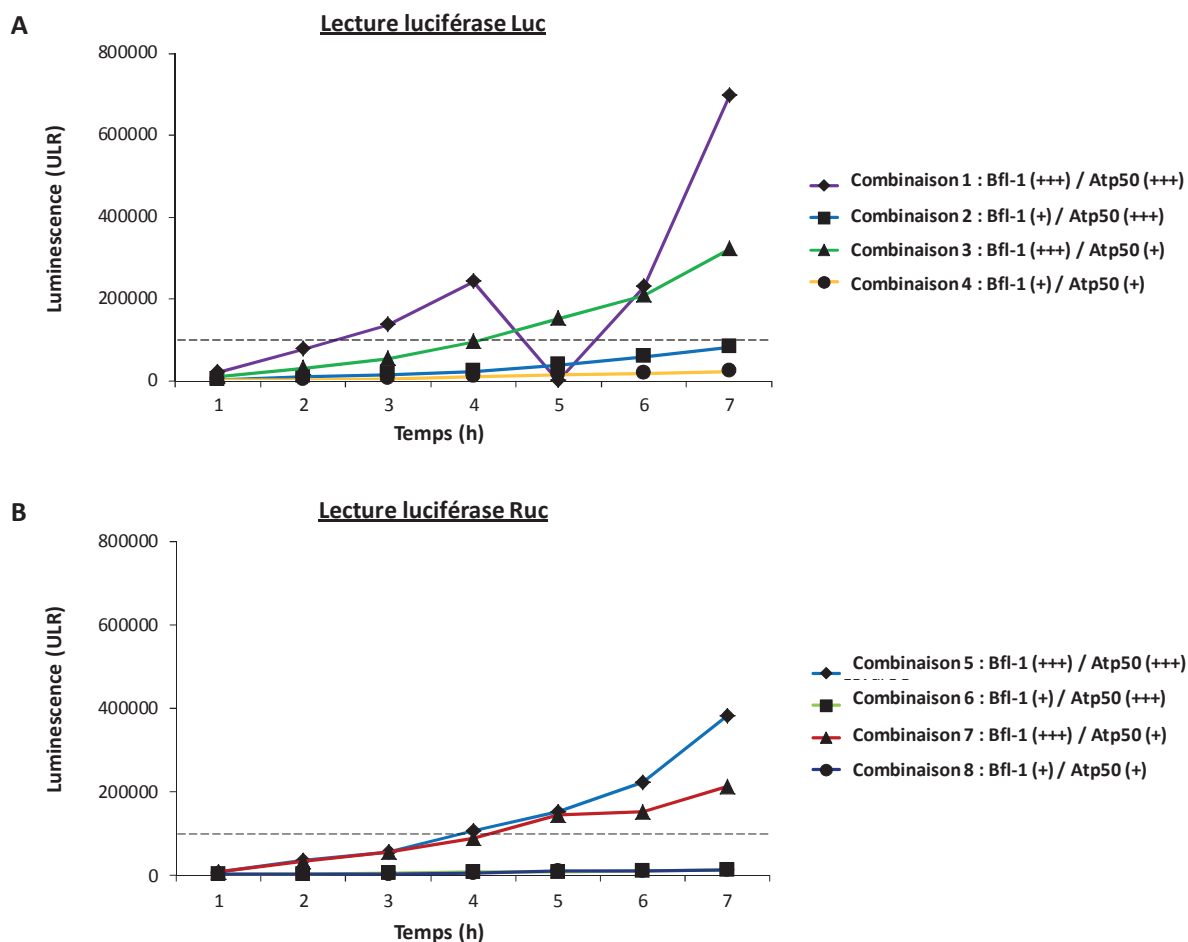


Figure 43 : Cinétique d'induction de l'expression de la luciférase Luc ou Ruc par le galactose

Les levures transformées, contenant le gène Luc ou Ruc et exprimant Bfl-1 et Apt50, ont été cultivées dans le milieu synthétique approprié contenant du DMSO 1% final à 30°C sous agitation. L'expression de Apt50 a été induite par l'ajout de galactose 2% final et la luminescence **(A)** Luc ou **(B)** Ruc a été mesurée toutes les heures. ULR = unité de lumière relative ; (+) = gène codé par un plasmide ayant une origine de répllication faible nombre de copie ; (+++) = gène codé par un plasmide ayant une origine de répllication grand nombre de copie ; --- = seuil de 100 000 ULR.

Les levures transformées avec les combinaisons 1 à 4 possèdent le gène rapporteur Luc et celles transformées avec les combinaisons 5 à 8 possèdent le gène rapporteur Ruc. Comme observé lors des précédents cribles réalisés à Imaxio, les signaux Luc sont plus élevés que les signaux Ruc pour une même interaction (comparer les figures 43A et 43B). De plus, dans la configuration Luc, les levures transformées avec les combinaisons 1 ou 3 (origine de répllication grand nombre de copies pour l'expression de Bfl-1) induisent des signaux luminescents plus élevés que les levures transformées avec les combinaisons 2 ou 4 (origine de répllication faible nombre de copies pour l'expression de Bfl-1, Figure 43A). Le même profil est obtenu dans la configuration Ruc. En revanche, le nombre de copies pour

l'expression de Apt50 ne module pas significativement les signaux luminescents émis. Ces résultats suggèrent que la quantité de Bfl-1, par rapport à celle de Apt50, a un impact prépondérant sur le signal luminescent.

Un signal luminescent de plus de 100 000 ULR est nécessaire pour observer clairement une inhibition du signal lors du crible. Dans ce contexte, seules les levures transformées avec les combinaisons 1, 3, 5 ou 7 émettent des signaux luminescents Luc ou Ruc supérieurs à 100 000 ULR après 6h d'induction (Figure 43).

Afin de confirmer le phénotype d'émission de la luminescence des levures transformées avec chacune des combinaisons, un deuxième essai a été réalisé après 6h d'induction. Les levures ont été cultivées en présence de galactose et de DMSO et la luminescence a été mesurée 6h et 7h après l'ajout de galactose (Figure 44). Les résultats sont présentés de manière à comparer les signaux luminescents émis par les levures transformées avec les combinaisons Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Luc (combinaisons 1 à 4) avec les signaux luminescents émis par les levures transformées avec les combinaisons appât-Ctl/proie-Ctl-Ruc (combinaisons Ctl5 à Ctl8) (Figure 44A). Les levures choisies pour le couple de combinaison Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Luc (1 à 4) et appât-Ctl/proie-Ctl-Ruc (Ctl5 à Ctl8) doivent émettre des signaux luminescents d'intensité similaires.

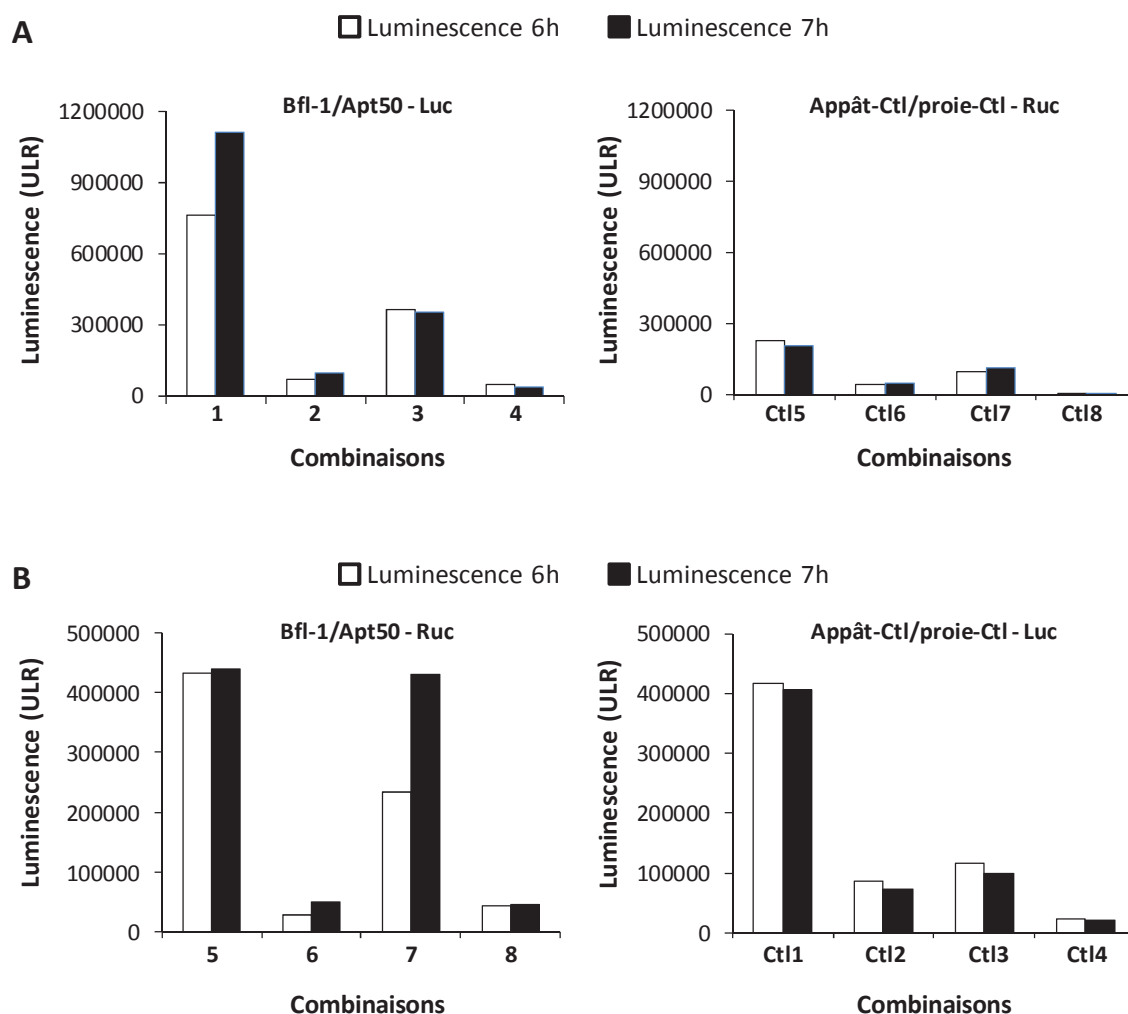


Figure 44 : Comparaison des signaux luminescents émis par les levures exprimant Bfl-1 Δ Cter/Apt50 avec ceux émis par les levures exprimant appât-Ctl/proie-Ctl

Signaux luminescents après 6h et 7h d'induction par le galactose. Les levures ont été cultivées dans du milieu synthétique approprié à 30°C sous agitation et la luminescence a été mesurée 6h ou 7h après l'ajout du galactose 2% final et de DMSO 1% final. **(A)** Levures exprimant l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 associée au rapporteur Luc (combinaisons 1 à 4) et levures exprimant l'interaction contrôle associée au rapporteur Ruc (combinaisons Ctl5 à Ctl8). **(B)** Levures exprimant l'interaction contrôle associée au rapporteur Luc (combinaisons Ctl1 à Ctl4) et levures exprimant l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 associée au rapporteur Ruc (combinaisons 5 à 8). ULR = unité de lumière relative.

Seules les levures transformées avec la combinaison 3 (350 000 ULR) et les levures transformées avec la combinaison Ctl5 (200 000 ULR) présentent des signaux luminescents comparables (Figure 44A).

Les levures choisies pour le deuxième couple de combinaison appât-Ctl/proie-Ctl-Luc (Ctl1 à Ctl4) + Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Ruc (5 à 8) doivent émettre des signaux luminescents

d'intensité similaires. Les résultats présentés dans la [figure 44B](#) permettent de comparer les signaux luminescents émis par les levures transformées avec les combinaisons appât-Ctl/proie-Ctl-Luc (combinaisons Ctl1 à Ctl4) avec les signaux luminescents émis par les levures transformées avec les combinaisons Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Ruc (combinaisons 5 à 8). Les levures transformées avec la combinaison 5 et les levures transformées avec la combinaison Ctl1 émettent des signaux luminescents d'environ 430 000 ULR à 6 et 7h ([Figure 44B](#)). Les levures transformées avec la combinaison 7 et les levures transformées avec la combinaison Ctl1 émettent des signaux d'environ 430 000 ULR uniquement à 7h ([Figure 44B](#)).

En conclusion, le couple de combinaisons 5 et Ctl1 et le couple de combinaisons 7 et Ctl1 ont été utilisés pour le deuxième test pilote car les signaux luminescents correspondant étaient similaires. Etant donné que les signaux luminescents correspondants aux combinaisons 5 et Ctl1 sont similaires à 6 et 7h. Ces deux temps d'induction pouvaient encore être possibles pour le crible monodose.

2-1-1b/ Test 2 : validation du choix des paramètres dans les conditions du crible monodose

Au cours du test 1, les 40 cultures de levures transformées avec chacune des 40 combinaisons ont été cultivées séparément. Le test 2 a pour objectif de valider le meilleur couple de combinaisons dans les conditions du crible monodose haut débit. Un mélange des levures transformées avec les combinaisons 5 et Ctl1 et un mélange des levures transformées avec les combinaisons 7 et Ctl1 ont été cultivés. La luminescence a été mesurée 6h et 7h après l'ajout de galactose et de DMSO ([Figure 45](#)).

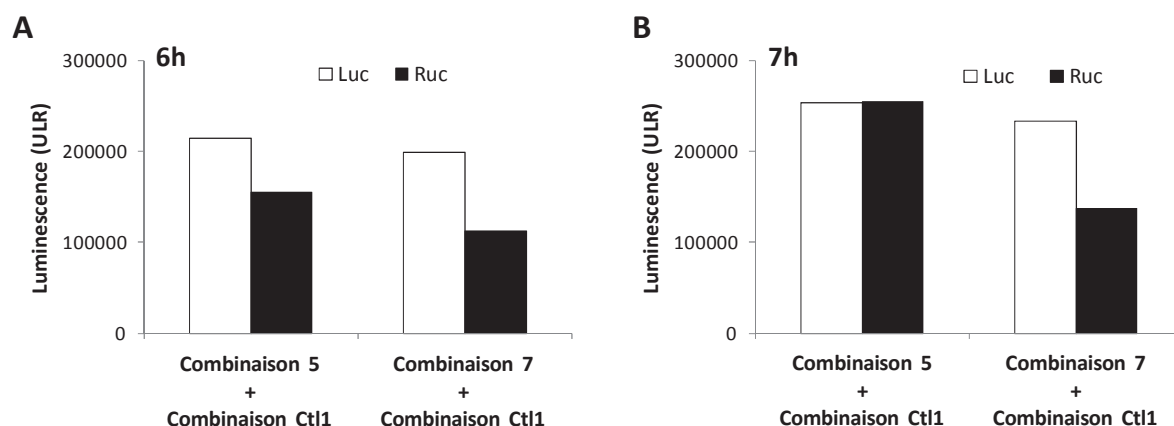


Figure 45 : Validation du meilleur couple de combinaisons et du temps d'induction pour le crible monodose

Signaux luminescents après 6h ou 7h d'induction par le galactose. Les levures ont été mélangées à la même densité et cultivées à 30°C sous agitation. Les luminescences Luc et Ruc ont été mesurées à **(A)** 6h ou **(B)** 7h après l'ajout de galactose 2% final et de DMSO 1% final. ULR = unité de lumière relative.

Le mélange des levures transformées avec les combinaisons 5 et Ctl1 après 6h d'induction et le mélange des levures transformées avec les combinaisons 7 et Ctl1 après 6 et 7h d'induction présentent des signaux luminescents Luc et Ruc différents (Figure 45 A-B). En revanche, seul le mélange de levures transformées avec les combinaisons 5 et Ctl1 présentent des signaux luminescents Luc et Ruc similaires après 7h d'induction (Figure 45B). Ces signaux luminescents étant suffisamment élevés pour visualiser une inhibition et d'intensité correcte par rapport à la sensibilité de l'appareil, le couple de combinaisons 5 et Ctl1 a été choisi pour le crible monodose.

2-1-2/ Crible monodose sur l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50

Le crible monodose correspond au crible haut débit des 58 683 petites molécules sur les interactions Bfl-1ΔCter/Apt50 et appât-Ctl/proie-Ctl. Chaque puits a été induit par du galactose 2% final auxquels ont été ajoutés les molécules à 10 μM final et le mélange de levures transformées avec les combinaisons 5 (Bfl-1ΔCter(++) / Apt50(++) - Ruc) ou Ctl1 (appât-Ctl(++) / proie-Ctl(++) - Luc) (Tableau – 3). La luminescence a été mesurée après 7h d'induction par le galactose et le pourcentage d'inhibition de la luminescence de chaque

molécule a été calculé. Pour chaque molécule, le pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 est présenté en fonction du pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle (Figure 46). La valeur du pourcentage d'inhibition représente la capacité de la molécule à empêcher l'interaction protéine-protéine. Une valeur proche de 100% signifie que la molécule empêche efficacement l'interaction protéine-protéine. Cependant, l'effet maximal couramment observé est d'environ 80% d'inhibition. Par opposition, une valeur proche de 0% reflète une molécule incapable d'empêcher l'interaction protéine-protéine (Figure 46 : cercle jaune). Les molécules ayant un pourcentage d'inhibition de même valeur pour l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et pour l'interaction appât-contrôle/proie-contrôle sont toxiques ou aspécifiques (Figure 46 : encadré vert).

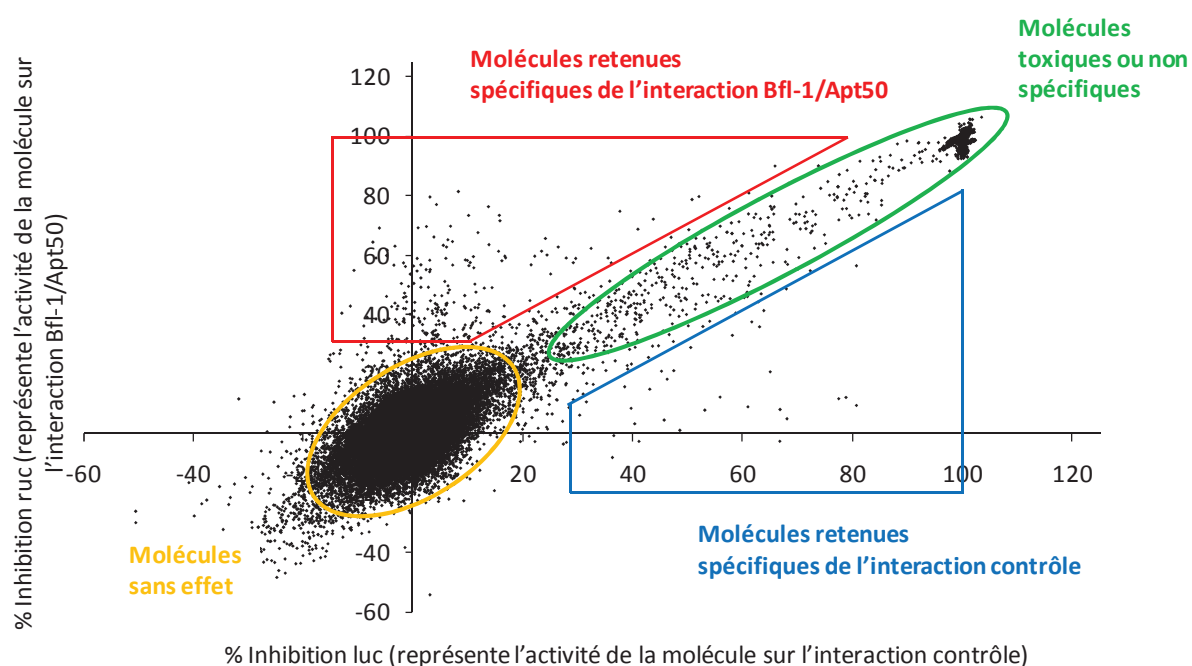


Figure 46 : Représentation du pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 en fonction du pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle pour chaque molécule

Un mélange de levures transformées avec les combinaisons 5 et Ctl1 a été ensemencé dans du milieu synthétique approprié. Les molécules (10 μ M) ou le DMSO ainsi que le galactose 2% final ont été ajoutés au milieu de culture et les plaques ont été incubées à 30°C pendant 7h. Les luminescences Luc et Ruc émises ont été mesurées. Chaque point du graphe représente une molécule.

Une molécule est considérée active si son pourcentage d'inhibition est supérieur à 30%. 3 137 molécules ayant un pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50

supérieur à 30% ont été sélectionnées. Parmi ces molécules, certaines sont toxiques ou capables d'empêcher également l'interaction appât-contrôle/proie-contrôle. Afin de les éliminer, seules les molécules pour lesquelles la différence entre le pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et le pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle est supérieur ou égale à 20% ont été sélectionnées. 324 molécules répondant à ces critères ont été retenues pour les tests de confirmation monodose (Figure 46 : encadré rouge). La même analyse a été réalisée pour l'interaction contrôle (Figure 46 : encadré bleu).

2-1-3/ Confirmation monodose

Un test de confirmation monodose dans les conditions du crible et un test de confirmation monodose avec inversion des rapporteurs ont été réalisés (Figure 42, étape 4). Un mélange de levures transformées avec les combinaisons 3 (Bfl-1 Δ Cter/Apt50-Luc) et Ctl5 (appât-Ctl/proie-Ctl-Ruc) émettant des signaux du même ordre de grandeur à 7h (Figure 43) a été utilisé pour le test de confirmation monodose avec inversion des rapporteurs. Les molécules (10 μ M) et le galactose (2% final) ont été ajoutés au mélange de levures transformées avec les combinaisons 5 et de levures transformées avec la combinaison Ctl1 (confirmation dans les conditions du crible monodose). La même opération a été effectuée avec le mélange de levures transformées avec la combinaison 3 et de levures transformées avec la combinaison Ctl5 (confirmation avec inversion des rapporteurs). La luminescence a été mesurée après 7h d'induction par le galactose et le pourcentage d'inhibition de la luminescence a été calculé. En utilisant les mêmes critères d'analyse que précédemment, 7 molécules ont été retenues (résultats non montrés).

2-1-4/ Confirmation dose-réponse

Pour explorer la spécificité des molécules par rapport à l'interaction contrôle à différentes concentrations, une confirmation dose-réponse a été réalisée. Cette confirmation en dose-réponse a été réalisée sur un nouveau lot de chaque molécule afin de

s'affranchir de la stabilité des composés. Les dose-réponses ont été réalisées dans les conditions du crible monodose (combinaisons 5 et Ctl1) en faisant varier la concentration des molécules de 0,4 à 30 μM (Figure 47). Les molécules ayant une activité sur l'interaction Bfl-1 ΔCter /Apt50 ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- Pourcentage d'inhibition supérieur à 30% à la plus forte dose, soit 30 μM ,
- Différence du pourcentage d'inhibition entre l'interaction contrôle et l'interaction Bfl-1 ΔCter /Apt50 d'au moins 20% à la plus forte dose,
- Différence du pourcentage d'inhibition entre l'interaction contrôle et l'interaction Bfl-1 ΔCter /Apt50 maintenue à plus faibles concentrations.

3 molécules ont ainsi été retenues et ont été nommées IBF-79, IBF-80 et IBF-81 (inhibiteur de Bfl-1) (Figure 47). En effet, IBF-79, IBF-80 et IBF-81 présentent des pourcentages d'inhibition de l'interaction Bfl-1 ΔCter /Apt50 supérieurs à 74%, alors que le pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle ne dépasse pas 51% pour ces mêmes molécules. Ainsi, ces trois molécules répondent au deux premiers critères. Alors que la spécificité vis-à-vis de l'interaction Bfl-1 ΔCter /Apt50 est perdue à de faibles concentrations de IBF-79 ou de IBF-81, la différence de luminescence est maintenue à ces mêmes concentrations pour IBF-80. De plus, un plateau est obtenu dès 5 μM avec IBF-81, expliquant la faible EC_{50} observée pour IBF-81 par rapport à IBF-79 et IBF-80. En conclusion, bien que ces trois molécules présentent des profils différents, elles répondent aux trois critères de sélection. A titre d'exemple, le profil d'inhibition d'une molécule non confirmée, car n'empêchant aucune des deux interactions, est également présenté (Figure 47).

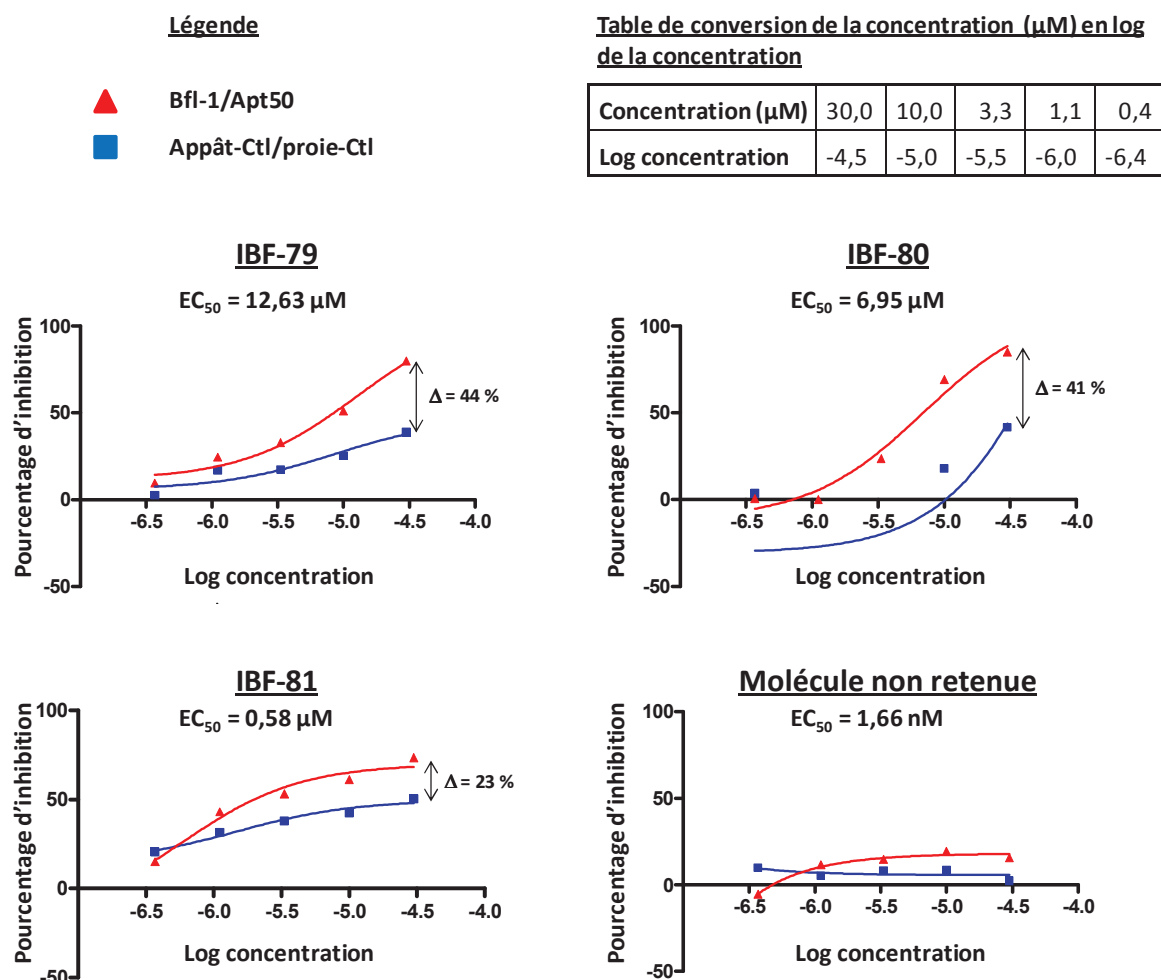


Figure 47 : Profils d'inhibition des interactions protéine-protéine induits par IBF-79, IBF-80 et IBF-81

Un mélange de levures transformées avec les combinaisons 5 et Ctl1 a étéensemencé à 30°C sous agitation dans du milieu synthétique approprié. Les luminescences Luc et Ruc ont été mesurées 7h après l'ajout de galactose 2% final et de molécule à différentes concentrations. EC_{50} = concentration à laquelle la molécule inhibe de moitié le signal luminescent ; Δ = différence entre le pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et de l'interaction contrôle.

2-1-5/ Conclusion

58 683 petites molécules ont été criblées pour leur capacité à empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 par la technique AptaScreen®. 324 molécules ont été sélectionnées pour les tests de confirmation monodose, à l'issue desquels 7 molécules ont été retenues. Enfin, l'analyse d'un nouveau lot de chacune des 7 molécules a permis de confirmer 3 molécules capables de rompre l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 de manière dose-dépendante, spécifique et reproductible (IBF-79, IBF-80 et IBF-81). Dans les conditions d'analyse décrites

précédemment ([chapitre 2-2](#)), un ratio d'une molécule retenue pour 1 000 molécules criblées est couramment observé. Comme seulement 3 molécules ont été isolées pour environ 60 000 criblées, une analyse complémentaire réalisée par un expert chemo-informaticien a permis de sélectionner 72 molécules supplémentaires, dont IBF-18, selon des critères analytiques plus complexes tenant compte des structures moléculaires des composés (résultats non montrés).

2 – 2/ Identification des molécules issues du crible *in silico* capables de rompre l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim par AptaScreen®

Le crible des 1 129 molécules issues du crible *in silico* a été réalisé sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim en suivant le même diagramme des processus décrit précédemment pour le crible de molécules sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 ([Figure 42](#)). En résumé, 33 molécules capables d'empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim-Luc ont été retenues à l'issue du crible monodose. Parmi ces 33 molécules, 5 répondaient aux critères de sélection lors des tests de confirmation monodose. Un nouveau lot de fabrication de 3 des 5 molécules, encore disponibles dans le commerce, a été analysé en dose-réponse ([Figure 48](#)). Ces 3 molécules (IBF-75, IBF-82 et IBF-83) ont été retenues car elles répondent aux critères définis précédemment. En effet, IBF-75, IBF-82 et IBF-83 présentent des pourcentages d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim supérieurs à 65%, et une différence entre le pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim et le pourcentage d'inhibition de l'interaction contrôle d'au moins 37%. Ainsi, ces trois molécules répondent aux deux premiers critères. Bien que les molécules IBF-82 et IBF-83 semblent capables d'empêcher l'interaction appât-contrôle/proie-contrôle aux fortes concentrations, leur capacité à empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim est bien plus élevée à ces mêmes concentrations, démontrant une forte spécificité vis-à-vis de Bfl-1. Ainsi, les molécules IBF-75, IBF-82 et IBF-83 semblent empêcher efficacement l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim, alors qu'elles n'avaient pas d'effet sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50. Cependant, IBF-75, IBF-82 et IBF-83 perdent leur capacité à

empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim en dessous de 1 μ M (abscisse -5,9 environ) (Figure 48).

Par ailleurs, l'analyse complémentaire réalisée par l'expert chemo-informaticien a révélé 5 molécules supplémentaires. 8 molécules capables d'empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim ont donc été retenues.

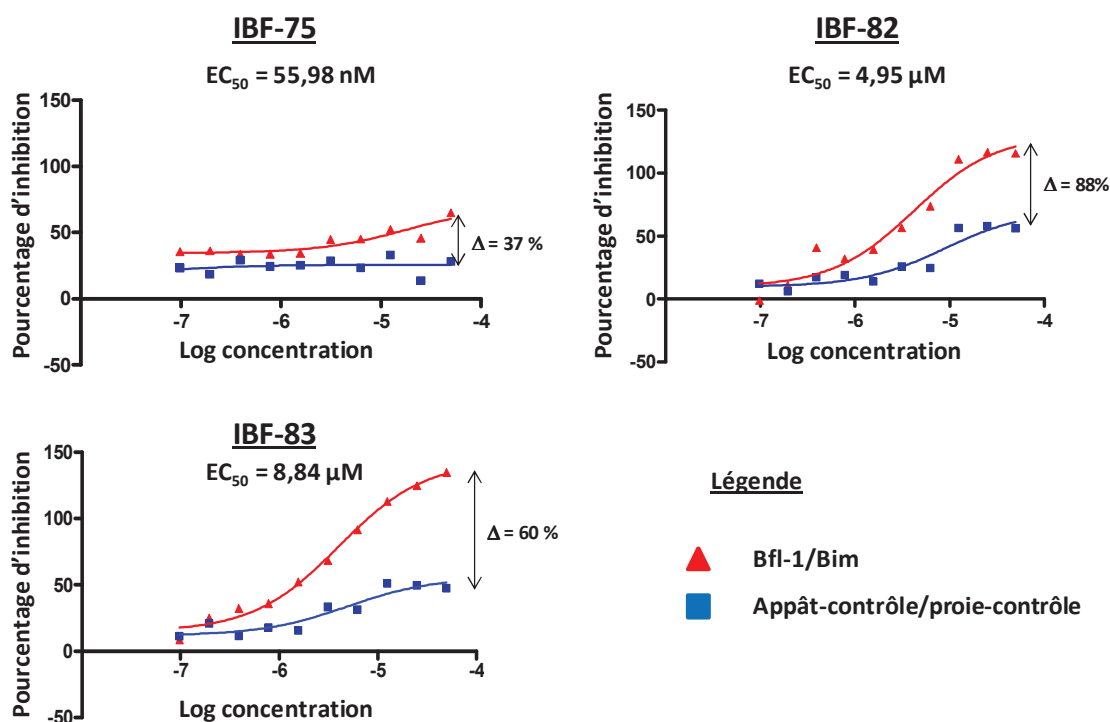


Table de conversion de la concentration (μ M) en log de la concentration

Concentration (μ M)	30,0	15,0	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47	0,23	0,12	0,06
Log concentration	-4,5	-4,8	-5,1	-5,4	-5,7	-6,0	-6,3	-6,6	-6,9	-7,2

Figure 48 : Profils d'inhibition des interactions protéine-protéine induits par 3 molécules capables d'empêcher l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim

Les levures exprimant l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim et le gène rapporteur Luc et les levures transformées avec la combinaison Ctl5 ont été mélangées à la même densité et cultivées à 30°C sous agitation. Les luminescences Luc et Ruc ont été mesurées 7h après l'ajout de galactose 2% final et de molécule à différentes concentrations. EC₅₀ = concentration à laquelle la molécule inhibe de moitié le signal luminescent ; Δ = différence entre le pourcentage d'inhibition de l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim et de l'interaction contrôle.

2 – 3/ Conclusions sur les cribles

Les deux cribles Aptascreen® ont permis d'identifier 83 molécules capables d'empêcher les interactions Bfl-1 Δ Cter/Apt50 et Bfl-1 Δ Cter/Bim (Tableau – 4). Ces molécules ont été nommées IBF pour inhibiteur de Bfl-1 et ont ensuite été caractérisées par des tests *in vitro*. Comme certaines molécules n'étaient plus commercialisées et difficilement synthétisables, 67 molécules et 3 analogues ont finalement été étudiés *in vitro*.

Tableau – 4 : Bilan des molécules retenues à l'issue des cribles Aptascreen

Interaction étudiée Chimiothèque	Bfl-1/Apt50	Bfl-1/Bim
Enrichie (par un crible <i>in silico</i>)	1	8
Aléatoire	74	

Nombre de molécules retenues pour chaque chimiothèque et interaction étudiée.

2 – 4/ Caractérisation biochimique et fonctionnelle des petites molécules issues des cribles Aptascreen®

Des tests biochimiques cellulaires et acellulaires et des tests fonctionnels ont été réalisés pour évaluer la spécificité, la toxicité et la fonction des 70 molécules retenues. L'ensemble de ces tests a été effectué par deux ingénieurs de recherche au sein du laboratoire INSERM.

Les petites molécules ont été évaluées, dans un premier temps, pour leur capacité à rompre une interaction protéine-protéine dans des cellules humaines épithéliales de rein embryonnaires 293T exprimant de manière ectopique un des membres de la famille Bcl-2 par un test de reconstitution de la fluorescence YFP (BiFC) (Kerppola, 2006; Kerppola, 2008). En parallèle, leur toxicité sur les cellules 293T non transfectées a été évaluée. Les molécules

induisant moins de 20% de mort cellulaire à 50 μ M ont été considérées comme non toxiques. 27 molécules non toxiques capables de rompre les interactions Bfl-1/Apt50, Bfl-1/Bim ou Bfl-1/Bid à 50 μ M ont été révélées. Parmi ces molécules, 14 étaient capables de rompre l'interaction Bfl-1/Bim en dose-réponse par la technique de BiFC. Cependant, ces 14 molécules étaient également capables de rompre les interactions Bcl-2/Bim, Bcl-x_L/Bim et Mcl-1/Bim en dose-réponse. Par conséquent, ces 14 molécules ne sont pas spécifiques de Bfl-1 dans ce test de surexpression des protéines de la famille Bcl-2. Néanmoins, ces molécules ont été retenues pour les tests de caractérisation suivants.

Dans un deuxième temps, les 14 molécules ont été évaluées sur plusieurs critères à l'aide de 5 tests différents. Leur capacité à rompre une interaction protéine-protéine sur protéines recombinantes a été analysée par des essais de pull-down et de polarisation de la fluorescence. Leur capacité à induire spécifiquement la mort de fibroblastes de souris sur-exprimant stablement Bfl-1 (cellules NIH3T3-Bfl-1) par rapport à des fibroblastes de souris sur-exprimant Bcl-x_L (cellules NIH3T3-Bcl-x_L) a également été étudiée pour valider la spécificité des molécules vis-à-vis de Bfl-1 par rapport à Bcl-x_L. Afin de déterminer si la mort cellulaire induite par les molécules est dépendante de la voie mitochondriale, impliquant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, la toxicité des molécules a été évaluée sur des fibroblastes d'embryon de souris sauvages (MEF-WT) ou n'exprimant ni Bax ni Bak (MEF-DKO pour double « knockdown »). Aussi, les molécules toxiques sur les MEF-WT, mais pas les MEF-DKO induisent une mort cellulaire spécifiquement via la mitochondrie impliquant les membres de la famille Bcl-2. Enfin, dans le but de développer un inhibiteur de Bfl-1 à visée thérapeutique, il est essentiel d'évaluer la toxicité des molécules sur des cellules saines par rapport à des cellules cancéreuses. Ainsi, l'aptitude des molécules à induire la mort des lignées lymphoblastoïdes B, pour lesquelles Bfl-1 est responsable de la survie, par rapport à des PBMC saines au repos a été explorée. Les molécules recherchées sont toxiques sur les lignées lymphoblastoïdes B, mais pas sur les PBMC. L'ensemble de ces analyses a permis d'isoler 7 molécules (IBF-1, IBF-18, IBF-72, IBF-74, IBF-75, IBF80 et IBF-81) ayant un effet positif dans au moins un des tests précédents. Parmi ces molécules, 3 étaient issues du crible *in silico* (Tableau – 5). Leurs caractérisations biochimiques et fonctionnelles sont résumées dans l'annexe.

Tableau 5 : Origine de la sélection Aptascreen® des molécules retenues après caractérisation *in vitro*

Chimiothèque	Nom de la molécule	Interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50	Interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim
Aléatoire	IBF-1		
	IBF-18		
	IBF-80		
	IBF-81		
Enrichie (crible <i>in silico</i>)	IBF-72		
	IBF-74		
	IBF-75		

Vert = molécule sélectionnée sur l'interaction étudiée ; Rouge = molécule non sélectionnée sur l'interaction étudiée ; Gris = non étudié.

2 – 5/ Rôle des molécules inhibitrices de Bfl-1 sur la mortalité de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1

2-5-1/ IBF-18 induit spécifiquement la mort des cellules T MT-4 infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 est responsable de leur survie

Comme il n'existe pas de traitement efficace contre l'ATLL, nous avons exploré la capacité des molécules dirigées contre Bfl-1 à induire spécifiquement la mort des cellules T infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 contribue à leur survie.

Nous avons précédemment montré que l'inhibition de l'expression de Bfl-1 par shARN induit près de 90% de mort des cellules MT-4 infectées par HTLV-1 (article Macaire et al., Figure 7 de l'article et Figure 49A). Dans le but d'explorer la capacité des petites molécules anti-Bfl-1 à induire la mort de cellules sensibles à l'extinction de l'expression de Bfl-1, les cellules MT-4 ont été traitées avec différentes concentrations des molécules IBF-18,

IBF-72, IBF-74 et IBF-81. La mortalité cellulaire a été quantifiée après 48h de traitement par incorporation d'iodure de propidium par cytométrie en flux (Figure 49B). Nos résultats montrent clairement que les molécules IBF-72, IBF-75 et IBF-81 n'induisent pas la mort des cellules MT-4, même à de fortes concentrations. En revanche, la molécule IBF-18 induit la mort des cellules MT-4 de manière dose-dépendante dès 3,2 μ M.

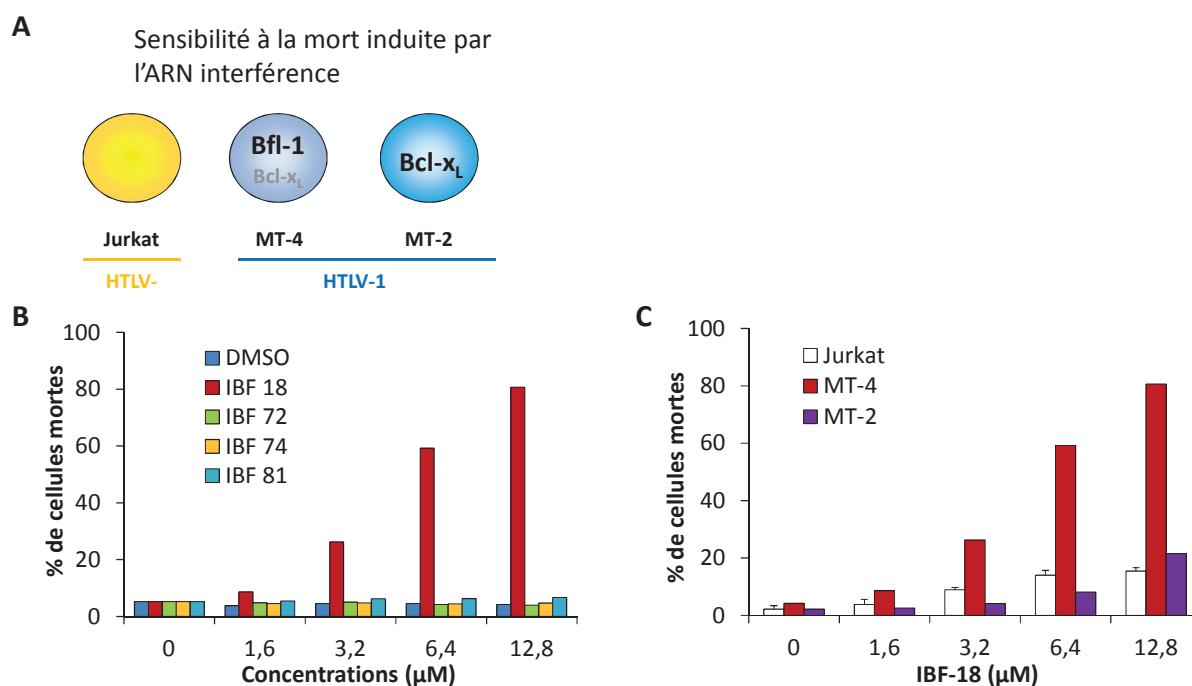


Figure 49 : Effet des petites molécules sur la mortalité des lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1

(A) Rappel de la sensibilité de différentes lignées cellulaires à la mort induite par les shARN dirigés contre Bfl-1 ou Bcl-x_L. Jurkat : lignée cellulaire T non infectée et non sensible à la mort induite par les shARN de Bfl-1 ou de Bcl-x_L. MT-4 : lignée cellulaire T infectée par HTLV-1 et préférentiellement sensible à la mort induite par le shARN de Bfl-1. MT-2 : lignée cellulaire T infectée par HTLV-1 et sensible à la mort induite par le shARN de Bcl-x_L (voir Figure 36 pour les détails). **(B) Effet des molécules IBF-18, IBF-72, IBF-74 et IBF-81 sur la mortalité des cellules MT-4.** Les cellules ont été traitées avec les molécules ou du DMSO pendant 48h, puis la mortalité a été mesurée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. Ces résultats préliminaires sont issus d'une expérience. **(C) Effet de la molécule IBF-18 sur la mortalité des cellules Jurkat, MT-4 et MT-2.** Les cellules ont été traitées avec la molécule IBF-18 pendant 48h, puis la mortalité a été mesurée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. Ces résultats préliminaires sont représentatifs d'une expérience parmi 1 ou 2 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite exploré la spécificité de la molécule IBF-18 dans des cellules MT-2 infectées par HTLV-1 pour lesquelles l'extinction de l'expression de Bcl-x_L, mais pas de Bfl-1,

par ARN interférence induit spontanément la mort de ces cellules. Les cellules T infectées MT-2 et non infectées Jurkat ont été traitées avec la molécule IBF-18 et la mortalité cellulaire a été analysée après 48h (Figure 49C). Contrairement aux cellules MT-4 (Figure 49 B et C), les cellules MT-2 ne sont pas sensibles à la molécule IBF-18 à faible concentration (1,6 et 3,2 μ M) (Figure 49C). A forte concentration (12,8 μ M), la molécule IBF-18 induit entre 15 à 20% de mort des cellules MT-2. De même, la toxicité de la molécule IBF-18 a uniquement été retrouvée à 12,8 μ M dans les cellules Jurkat non sensibles à l'extinction de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par ARN interférence (Figure 49C), et également dans d'autres cellules T non infectées comme les cellules Sup-T1, Molt-4, HuT-78 et CEM (résultats non montrés).

Ces résultats suggèrent que la molécule IBF-18 induit spécifiquement la mort des cellules pour lesquelles Bfl-1, et non Bcl-x_L, est impliquée dans la survie et que cette molécule n'est pas toxique dans les cellules lymphoblastoïdes T non infectées à des concentrations inférieures à 12,8 μ M.

2-5-2/ IBF-18 sensibilise les cellules T MT-4 infectées par HTLV-1 à la mort induite par l'ABT-737

Bfl-1, et à un degré moindre Bcl-x_L, sont impliquées dans la survie de la lignée cellulaire T MT-4. Nous avons alors étudié l'effet combiné de l'ABT-737 pour cibler Bcl-x_L et de la molécule IBF-18 pour cibler Bfl-1 sur la mortalité des cellules MT-4 (Figure 50). Nous avons observé que la molécule IBF-18 induit la mort des cellules MT-4 de manière dose-dépendante de 0 à 3,2 μ M. De même, l'ABT-737 induit la mort des cellules MT-4 de manière dose-dépendante (Figures 50 et 37). Alors qu'un effet d'environ 30% sur la mortalité des cellules MT-4 est observé pour 3,2 μ M de la molécule IBF-18, ce même effet est obtenu dès 78 nM d'ABT-737, soit une concentration 40 fois moins importante que celle de la molécule IBF-18. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la molécule IBF18 est une molécule de première génération, alors que l'ABT-737 est une molécule déjà optimisée pour se fixer

dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L, et donc efficace à de plus faibles concentrations. Nous avons ensuite combiné l'ABT-737 et la molécule IBF-18. Alors que l'ABT-737 (78 nM) seul ou la molécule IBF-18 (3,2 µM) seule induisent respectivement 34% ou 30% de mort cellulaire, la combinaison de l'ABT-737 et de la molécule IBF-18, à ces mêmes concentrations, entraîne 83% de mortalité des cellules MT-4. Ainsi, la molécule IBF-18 synergise avec l'ABT-737 pour induire la mort des cellules MT-4.

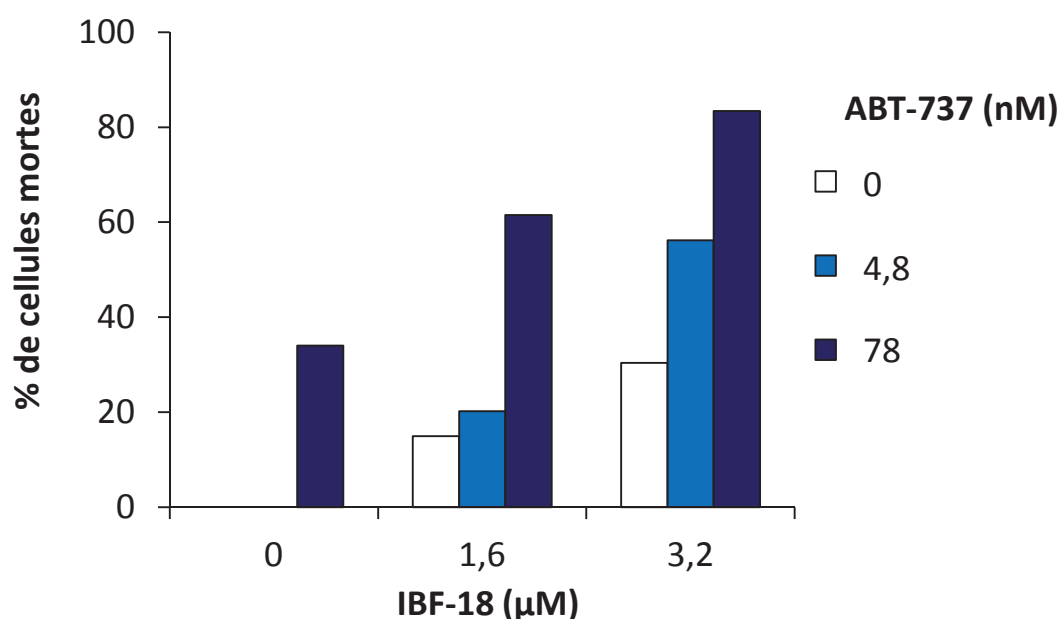


Figure 50 : La molécule IBF-18 sensibilise les cellules MT-4 à la mort cellulaire induite par l'ABT-737

Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de la molécule IBF-18 ou ABT-737 seule ou en combinaison pendant 48h. Puis, la viabilité a été mesurée par le kit ATP-lite. Les valeurs de viabilité (ULR) ont été normalisées par rapport au DMSO ajusté arbitrairement à 100% de viabilité. Les résultats sont présentés en pourcentage de mortalité. Ces résultats préliminaires sont issus d'une expérience. ULR = unité de lumière relative

En conclusion, la molécule IBF-18 inhibe spécifiquement la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 est responsable de leur survie. De plus, nous avons montré que la molécule IBF-18 n'est pas toxique sur des cellules leucémiques T non infectées et semble spécifique de Bfl-1 par rapport à Bcl-x_L, puisqu'elle est incapable d'induire la mort de cellules non sensibles au shARN de Bfl-1 et sensibles au shARN de Bcl-x_L.

L'ensemble de ces résultats valide également le modèle d'infection par HTLV-1 comme modèle d'étude pour le développement de petites molécules dirigées contre Bfl-1.

Parmi les 7 molécules sélectionnées à l'issue des tests de caractérisation *in vitro*, 3 autres molécules (IBF-72, IBF-74 et IBF-81) ont été étudiées et n'ont aucun d'effet sur la mort des cellules T infectées par HTLV-1 comme les cellules MT-4 et les cellules MT-2. Bien que ces molécules montrent des caractéristiques intéressantes dans d'autres tests *in vitro* (Annexe), elles semblent ne pas présenter d'intérêt pour le modèle d'infection par HTLV-1. Toutefois, ces molécules n'ont pas été testées dans les autres lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et 3 molécules additionnelles (IBF-1, IBF-75 et IBF-80) n'ont pas encore été analysées pour leur capacité à induire la mort de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour caractériser entièrement l'ensemble de ces 7 molécules dans le modèle d'infection par HTLV-1. Par ailleurs, l'ABT-737 et la molécule IBF-18 coopèrent pour induire la mort des cellules sensibles à l'extinction de Bcl-x_L et de Bfl-1. Ces données renforcent nos résultats montrant que Bfl-1 et Bcl-x_L sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le cas de l'ATLL. Par ailleurs, les effets secondaires étant proportionnels aux doses de chacune des molécules, le fait de combiner plusieurs molécules à de faibles concentrations permet de diminuer les effets secondaires par rapport à l'utilisation d'une seule molécule à plus forte concentration tout en maintenant l'effet bénéfique. Par conséquent, nos résultats confirment l'intérêt de combiner plusieurs drogues très spécifiques à de faibles doses pour le traitement de l'ATLL.

3/ CONCLUSIONS

Les études menées au laboratoire et par d'autres groupes ont montré que Bfl-1 est une cible thérapeutique potentielle pour des hémopathies B et pour la leucémie/lymphome T de l'adulte associée à HTLV-1. Dans le but de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces hémopathies, nous avons eu pour objectif d'identifier une molécule à visée thérapeutique dirigée contre Bfl-1. Dans ce contexte, un crible d'environ 60 000 molécules a permis d'identifier 83 molécules capables de rompre l'interaction

Bfl-1 Δ Cter/Apt50 ou Bfl-1 Δ Cter/Bim. Puis, des tests *in vitro* biochimiques ou fonctionnels ont révélé 7 molécules particulièrement intéressantes.

L'enrichissement de la chimiothèque par 1 129 molécules isolées *in silico* s'est révélé efficace. En effet, 3 molécules sur les 7 molécules retenues à l'issue des tests *in vitro* sont issues du crible *in silico*. L'une a été révélée sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50 (IBF-72) et les deux autres sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim (IBF-74 et IBF-75) lors de l'AptaScreen®. Par ailleurs, ces résultats suggèrent un meilleur rendement de l'AptaScreen® sur des ligands naturels, tels que Bim. Ce résultat est renforcé par le fait que 3 molécules ont été sélectionnées à l'issue du crible de 60 000 molécules sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Apt50, tandis que 3 à 5 molécules ont été sélectionnées à l'issue du crible de 1 129 molécules sur l'interaction Bfl-1 Δ Cter/Bim selon les mêmes critères d'analyse. Cette différence entre la proie naturelle (Bim) et la proie artificielle (Apt50) pourrait s'expliquer par le fait que l'aptamère peptidique soit plus petit que Bim et possède donc des sites d'ancrage différents dans la poche hydrophobe de Bfl-1. Une autre hypothèse serait que Bfl-1 pourrait adopter une conformation différente en présence de l'aptamère peptidique Apt50 ou de Bim. Or, le fait que le crible *in silico* ait été réalisé sur une structure de Bfl-1 obtenue en complexe avec le domaine BH3 de Bim explique entre autres la différence entre les résultats obtenus à l'issue des deux cribles. Enfin, l'affinité entre l'aptamère peptidique Apt50 et Bfl-1 pourrait être plus forte que celle entre Bim et Bfl-1 expliquant une plus grande facilité pour les molécules à rompre cette dernière interaction.

Parmi ces molécules, IBF-18 induit spécifiquement la mort de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, pour lesquelles Bfl-1 est responsable de leur survie. De plus, la molécule IBF-18 semble spécifique de Bfl-1 par rapport à Bcl-x_L dans les lignées infectées par HTLV-1 puisque les cellules MT-2 sensibles à la mort induite par un shARN de Bcl-x_L, mais pas de Bfl-1, sont insensibles à la mort induite par la molécule IBF-18. Par ailleurs, cette molécule n'est pas toxique sur des cellules n'exprimant pas Bfl-1 (PBMC au repos, lignée cellulaire humaine 293T, lignées leucémiques T non infectées). Cette propriété est indispensable car les molécules utilisées en thérapie doivent cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et ne doivent pas affecter les cellules saines. Des tests de toxicologie réalisés sur des souris saines permettraient de valider la toxicité de cette molécule *in vivo*.

4/ MATERIELS & METHODES

4 – 1/ Souche de levures, lignées cellulaires et réactifs

La souche de levure TB50 α -erg6 (souche ABC265 ; *Mat α ura3-52 leu2 Δ 1 lys2-801 his3 Δ 200 pep4 Δ ::HIS3 prb1 Δ 1.6R can1 erg6 Δ ::LEU2*) a été utilisée. Cette souche est plus perméable aux petites molécules en raison d'une mutation sur l'enzyme erg6 impliquée dans l'une des premières étapes de la synthèse du lipide membranaire ergostérol (*Mukhopadhyay et al., 2002*).

Les lignées cellulaires leucémiques T Jurkat (non infectée), MT-4 et MT-2 (infectées par HTLV-1) ont été cultivées dans du RPMI complémenté avec 10% final SVF, 2mM final de glutamine, 10 mM final d'Hepes et 40 μ g/ml final de gentamycine.

Le catalogue Express-Pick de la société ChemBridge (juin 2008) a été utilisé pour le crible *in silico*. Les molécules issues de ce crible *in silico* proviennent de la société ChemBridge. Les molécules, issues des chimiothèques aléatoires proviennent des chimiothèques commerciales Tripos, Prestwick, Nanosyn et ChemBridge. Les nouveaux lots de poudre fraîche des molécules IBF-72, IBF-74, IBF-79 et IBF-80 proviennent de la société ChemBridge, ceux de IBF-18 et IBF-81 proviennent respectivement des sociétés Life Chemicals et ChemDiv. L'ABT-737 provient de la société Selleck Chem (*Oltersdorf et al., 2005*). Les molécules ont été reprises à 1 mM en DMSO 100% aliquotées et congelées à -20°C.

4 – 2/ Clonage par recombinaison homologue chez la levure

Les plasmides pLP4-Apt27 et pLP4-Apt50 contenant une origine de répllication CEN/ARS (faible nombre de copies) et les plasmides pLP2-Apt27 et pLP2-Apt50 contenant une origine de répllication 2 μ (grand nombre de copies) ont été utilisés. Ces plasmides ont été construits respectivement à partir du vecteur pWP2-Apt27 et pWP2-Apt50. L'insert a été amplifié par PCR (5'-TACCCTTATGATGTGCCAG-3' et 5'-CCAGGTTGGCGTCCAGG-3') et cloné dans le vecteur pLP4 ou pLP2 digéré par RSRII par recombinaison homologue chez la levure (*Bickle et al., 2006*).

Le plasmide pHA1-Bfl-1 Δ Cter contenant une origine de répllication CEN/ARS a été construit à partir du vecteur pEG202-Bfl-1 Δ Cter (origine de répllication 2 μ). L'insert a été amplifié par

PCR (5'- GTTTAAACCAATTGTCG -3' et 5'- ATAAGAAATTCGCCCCG -3') et cloné dans le vecteur pHA1-Vide digéré par Xho et EcoRI par recombinaison homologue chez la levure.

Les plasmides pLP2-Bim et pLP4-Bim ont été utilisés. L'insert a été amplifié à partir du plasmide pcDNA3-Bim par PCR (5'- CTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCTGAATTCATGGCAAAGCAACCTTC -3' (sens) et 5'-TCTCCTGAATCCGCAAGGTGATCCCTGGGAACTCATGCATTCTCCACACC -3' ou 5'-GGAATTGCGTCTCGACTCTAGATGGCCAGCTAATGCATTCTCCACACC-3' (anti-sens) pour pLP2 et pLP4 respectivement) et cloné dans le vecteur pLP4 ou pLP2 digéré par RSRII par recombinaison homologue chez la levure.

Les plasmides concernant l'interaction contrôle ont été construits selon la même procédure.

4 – 3/ Transformation chez la levure

Le protocole utilisé a précédemment été décrit (*Bardou et al., 2009*). Les levures ont été congelées en présence de glycérol 15% final à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 3,5 et conservées à -80°C.

Les levures utilisées pour le crible de petites molécules sur l'interaction Bfl-1ΔCter/Apt50 sont décrites dans le chapitre 2-1-1. Les levures exprimant l'interaction Bfl-1ΔCter /Bim et le gène rapporteur Luc ont été transformées avec les plasmides pLP2-Bim, pHA1-Bfl-1ΔCter et le plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase Luc.

4 – 4/ Tests pilotes et confirmation en dose-réponse

1 ml de culture de levures exprimant l'interaction pLP2-Apt50/pEG202-Bfl-1 et le gène codant pour la luciférase Ruc ou de levures exprimant l'interaction pLP2-proie-contrôle/pEG202-appât-contrôle et le gène codant pour la luciférase Luc a été décongelé et cultivé dans 3 ml de milieu synthétique contenant 2% final de glucose à 30°C sous agitation à 230 rpm pendant 24h. Puis, 2 ml de ces cultures ont été ajoutés à 2 ml de milieu synthétique contenant 1% final de raffinose et 1% final de glycérol. Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation à 230 rpm pendant 24h. Les molécules diluées en DMSO 100% ([Figure 51A](#)) ou le DMSO 100% ([Figure 51B](#)) ont été dilués au 1/10 en eau et 2,5 µl ont été ajoutés dans les puits d'une plaque 96 demi-puits (Microton Greiner). Du galactose 2% final a ensuite été ajouté dans les puits pour induction. Après dilution à une DO₆₀₀ de 0,75, 20 µl de levures ont été distribués dans chaque puits. Deux puits ont été utilisés par condition. Après incubation

des plaques à 30°C pendant 7h, puis l'ajout de 20 µl de réactif Dual-Glo Luciférase (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI) suivi d'une heure d'incubation à 30°C, l'activité de la luciférase Luc a été mesurée par le lecteur de plaque EnVision (Perkin Elmer, Shelton, CT). Enfin, après l'ajout de 20 µl du réactif Dual-Glo Stop & Glo (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI), inhibant la réaction de luciférase Luc et permettant la réaction de luciférase Ruc, suivi d'une heure d'incubation à 30°C, l'activité de la luciférase Ruc a été mesurée par le lecteur de plaque (Bardou *et al.*, 2009).

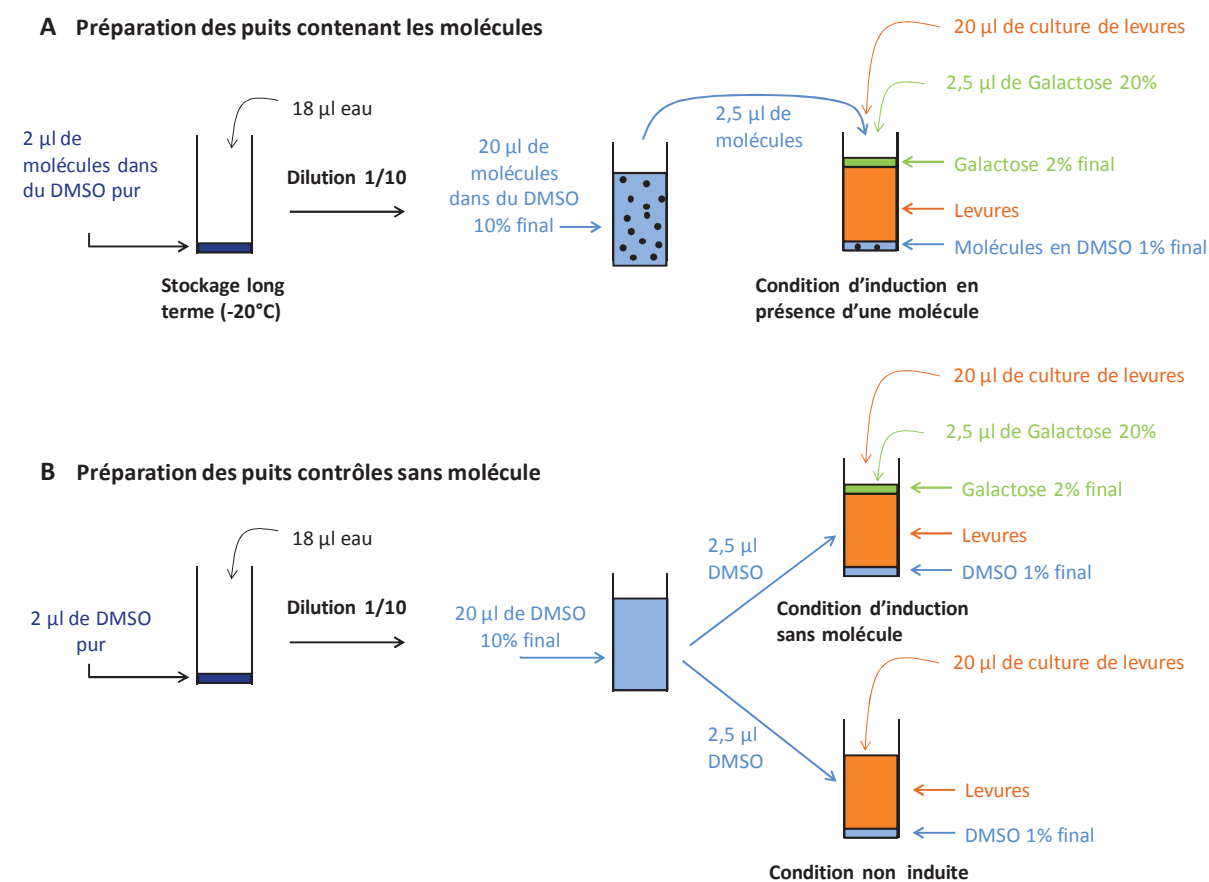


Figure 51 : Mode opératoire de mise en plaque

(A) Préparation des puits contenant les molécules. 2,5 µl de molécules diluées en DMSO 10% final, 2,5 µl de galactose 20% final et 20 µl de culture de levure ajustée à une DO_{600} de 0,75 ont été ajoutés par puits. **(B)** Préparation des puits contrôles. 2,5 µl de DMSO 10% final, 2,5 µl de galactose 20% final et 20 µl de culture de levure ajustée à une DO_{600} de 0,75 ont été ajoutés par puits induits. 2,5 µl de DMSO 10% final et 20 µl de culture de levure ajustée à une DO_{600} de 0,75 ont été ajoutés par puits non induits.

4 – 5/ Crible monodose haut débit Aptascreen®

50 ml de levures exprimant l'interaction pLP2-Apt50/pEG202-Bfl-1 et le gène codant pour la luciférase Ruc ou exprimant l'interaction pLP2-proie-contrôle/pEG202-appât-contrôle et le gène codant pour la luciférase Luc ont été décongelés et cultivés dans 150 ml de milieu synthétique contenant 2% final de glucose à 30°C sous agitation à 230 rpm pendant 24h. Puis, 100 ml de ces cultures ont été ajoutés à 300 ml de milieu synthétique contenant 1% final de raffinose et 1% final de glycérol. Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation à 230 rpm pendant 24h. Les levures diluées à une DO₆₀₀ de 0,75 ont été mélangées volume à volume. Du DMSO 1% final a été ajouté aux deux colonnes de chaque plaque 384 puits (Microton Greiner) et les molécules, préalablement diluées dans du DMSO 10%, ont été ajoutées à une concentration de 10 µM final. Du galactose 2% final a été distribué dans chaque puits excepté dans une des deux colonnes contenant uniquement du DMSO (condition non induite, [Figure 51B](#)). 20 µl du mélange de levures ont été distribués dans chaque puits et incubés à 30°C pendant 7h. Chaque molécule a été testée en simplicité. Après l'ajout de 20 µl de réactif Dual-Glo Luciférase (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI) suivi de 4 heures d'incubation à température ambiante, l'activité de la luciférase Luc a été mesurée par le lecteur de plaque. Enfin, après l'ajout de 20 µl du réactif Dual-Glo Stop & Glo (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI) suivi de 4 heures d'incubation à température ambiante, l'activité de la luciférase Ruc a été mesurée par le lecteur de plaque (*Bardou et al., 2009*).

4 – 6/ Calcul du pourcentage d'inhibition

L'étude en format de plaque 384 puits est associée à un effet bord marqué. Afin de s'affranchir de cet effet bord, un modèle de calcul informatique de traitement des données a été appliqué. Ce modèle a été développé par la société Imaxio (*Bardou et al., 2009*). Après traitement des données, le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$p_m = 100 * \frac{S_m - m_{NI}}{M_I - m_{NI}}$$

p_m = pourcentage d'inhibition de la luminescence par la molécule m

S_m = valeurs de luminescence du puits contenant la molécule m

M_I = moyenne des valeurs de luminescence des puits induits (puits contenant du DMSO, du galactose et pas de molécule)

m_{NI} = moyenne des valeurs de luminescence des puits non induits (puits contenant du DMSO, mais pas de galactose ni de molécule)

4 – 7/ Test de mortalité cellulaire

4.10^5 cellules ont été traitées avec les molécules (IBF pour inhibiteur de Bfl-1 et/ou ABT-737) ou du DMSO seul pendant 48h. La viabilité a été mesurée par ATP-lite (Perkin Elmer) et la luminescence a été mesurée au luminomètre (Infinite M200, Tecan). La mortalité a été mesurée après incorporation de 0,5 µg/ml d'iodure de propidium par cytométrie en flux (FACScan, BD Biosciences) et analysée avec le logiciel FlowJo.

Discussion générale et perspectives

Discussion

Les virus établissent des stratégies leur permettant d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte. Entre autres, les virus inhibent l'apoptose des cellules qu'ils infectent en exprimant des protéines virales homologues aux protéines cellulaires anti-apoptotiques ou en régulant l'expression des protéines cellulaires pro- et/ou anti-apoptotiques. Comme l'inhibition de l'apoptose est également une caractéristique des cancers, il n'est pas surprenant que des virus inhibant l'apoptose soient associés au développement de cancers.

L'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy-Bérard s'intéresse depuis plusieurs années à la protéine anti-apoptotique Bfl-1 de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'homéostasie lymphocytaire B et T et dans l'établissement de pathologies auto-immunes et d'hémopathies B. Dans le cas de leucémies/lymphomes viro-induits, l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourrait favoriser l'émergence de cancers. Comme nous l'avons vu précédemment, une surexpression de Bfl-1 et de Bcl-x_L a été documentée dans des lignées cellulaires B suite à l'expression de protéines virales de EBV et pourrait être impliquée dans l'émergence des pathologies associées à EBV, comme le lymphome de Burkitt. Nos données suggèrent que Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient jouer un rôle au cours du développement de l'ATLL. Contrairement au génome de EBV, qui peut aussi coder pour une protéine virale homologue aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, le génome de HTLV-1 code uniquement pour des protéines virales capables de réguler l'expression de gènes cellulaires impliqués dans l'apoptose. Il a notamment été décrit que la protéine virale Tax inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, augmente celle de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L et active le promoteur de *bfl-1*. C'était dans ce contexte que nous avons étudié le rôle des protéines virales Tax et HBZ dans la régulation de l'expression de Bfl-1, mais aussi de Bcl-x_L, et l'impact de ces deux protéines anti-apoptotiques sur la survie des cellules T infectées par HTLV-1.

1/ EXPRESSION ET ROLE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X_L DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LES CELLULES T INFECTÉES PAR HTLV-1

Suite à une étude prospective, nous avons observé une forte expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L de la famille Bcl-2 aussi bien dans des lignées cellulaires T non infectées que celles infectées par HTLV-1. De manière intéressante, Bfl-1 n'est pas exprimée dans les lignées leucémiques T non infectées testées, alors qu'elle est exprimée dans les cellules T infectées par HTLV-1 quel que soit leur phénotype CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ ou CD8⁺. Ces données suggèrent qu'à l'état basal l'expression de Bfl-1 serait spécifique du statut HTLV-1 positif de ces cellules T, et par conséquent, que Bfl-1 se distinguerait de Bcl-2 et de Bcl-x_L. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'étude bibliographique, l'ATLL est caractérisée principalement par une expansion clonale de cellules T CD4⁺ et dans de rares cas par une expansion de cellules T CD4⁺CD8⁺ ou CD8⁺ (*Ciminale et al., 2000; Hanon et al., 2000b; Richardson et al., 1990*). Le fait que l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L soit observée dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 indépendamment de leur phénotype CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ suggère que Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient être exprimées *in vivo* dans les cellules T infectées CD4⁺ et aussi dans les rares cas de cellules d'ATLL CD4⁺CD8⁺ ou CD8⁺.

D'autres groupes se sont intéressés à l'expression des protéines impliquées dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1. La comparaison de quatre études transcriptomiques de cellules non infectées par rapport à des cellules infectées par HTLV-1 réalisées sur puce ADN/ARN révèle que le profil de surexpression de A1/Bfl-1 ou de Bcl-x_L varie selon le type cellulaire, plutôt qu'en fonction de la nature de la puce utilisée (*de la Fuente et al., 2003; Harhaj et al., 1999; Pise-Masison et al., 2002; Ruckes et al., 2001*). Notre hypothèse selon laquelle Bfl-1 et Bcl-x_L seraient exprimées au cours du développement de l'ATLL est renforcée par la présence de *bfl-1* dans des PBMC infectées par HTLV-1 par rapport à des PBMC non infectées qui a été révélée par une étude sur puce à ADN/ARN (*Harhaj et al., 1999*). Enfin, nous avons montré l'expression de la protéine Bfl-1 dans des cellules issues de deux patients atteints d'ATLL (résultats non montrés).

Quelle est la relevance physiologique de cette surexpression de Bfl-1 et de Bcl-x_L ? Ces deux protéines sont-elles impliquées dans la survie et la résistance à l'apoptose des cellules infectées par HTLV-1 ? En accord avec un rôle potentiel de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L dans le développement de l'ATLL, nos résultats montrent qu'après extinction de l'expression de l'une de ces protéines par la stratégie d'ARN interférence **Bfl-1, Bcl-x_L ou Bfl-1 et Bcl-x_L sont impliquées dans la survie des cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1.** Nous avons également observé que ces deux protéines coopèrent pour induire la survie des cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1. En revanche, Bcl-2 n'est pas un gène de survie dans les cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1 étudiées.

D'après Zane *et al.*, l'infection par HTLV-1 ne semble pas moduler les mécanismes de survie par rapport aux clones T CD4⁺ non infectés (Zane *et al.*, 2010a). Leurs études montrent également que l'infection par HTLV-1 ne semble pas favoriser la survie des clones T CD4⁺ suite à l'engagement du récepteur de Fas (Zane *et al.*, 2010b). Nos observations et celles de Zane *et al.*, apparemment contradictoires, ne sont pas exclusives puisque les types cellulaires étudiés et les conditions d'induction de la mort cellulaires sont différents. De plus, nous avons vu dans l'étude bibliographique que la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale conduisant à l'apoptose sont indépendantes. En effet, l'expression de Bcl-2, de Bcl-x_L ou de Bfl-1 n'inhibe pas la mort cellulaire induite par Fas (Huang *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Strasser *et al.*, 1995). L'ensemble de ces données suggère que l'infection par HTLV-1 favorise la voie mitochondriale (notre article) plutôt que la voie des récepteurs de mort (Zane *et al.*, 2010a) pour induire la survie des cellules T CD4⁺ infectées.

Par ailleurs, Zane *et al.* décrivent que l'infection par HTLV-1 favorise plutôt la prolifération des clones T CD4⁺. De façon intéressante, des données de la littérature indiquent que Bfl-1 est impliquée dans la prolifération cellulaire (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998; Zhou *et al.*, 2007). En particulier, une surexpression de Bfl-1 favorise la prolifération spontanée de cellules épithéliales rénales de rats (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). Dans des conditions pathologiques, l'expression de Bfl-1 pourrait augmenter la prolifération de lignées cellulaires de lymphome B (Zhou *et al.*, 2007). Par conséquent, il est possible que Bfl-1 puisse jouer un rôle dans la prolifération des cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1. Ainsi, Bfl-1 se distingue de Bcl-x_L qui retarde la progression du cycle cellulaire en stabilisant le point de contrôle G2/M (Schmitt *et al.*, 2007).

En résumé, ce travail a permis de démontrer que les protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Cependant, il est nécessaire de déterminer le niveau d'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans un large panel de cellules de patient atteints d'ATLL pour valider l'expression de ces deux protéines *ex vivo*. Nous avons également montré que Bfl-1 et Bcl-x_L sont impliquées dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Par conséquent, Bfl-1 est la seule protéine virale spécifique du statut HTLV-1 positif et impliquée à la fois dans la survie et potentiellement dans la prolifération cellulaire, suggérant que cette protéine joue un rôle essentiel dans les cellules T infectées par HTLV-1 par rapport à Bcl-x_L. Cependant, le rôle de Bfl-1 dans la prolifération des cellules T CD4⁺ infectées par HTLV-1 reste à démontrer.

2/ REGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X_L DE LA FAMILLE BCL-2 PAR LES PROTEINES VIRALES TAX ET HBZ ET CONSEQUENCES SUR LA SURVIE CELLULAIRE

Parmi les protéines virales de HTLV-1, Tax et HBZ jouent un rôle déterminant dans le développement de l'ATLL. Tax, qui est plus fortement exprimée au cours des étapes précoces, participe plutôt à l'initiation de la leucémogénèse. Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, l'expression de Tax n'est pas toujours maintenue, contrairement à celle de HBZ. En favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, HBZ jouerait un rôle majeur dans le maintien du phénotype tumoral au cours des étapes tardives. Mes travaux de thèse ont permis de montrer que les protéines virales Tax et HBZ induisent l'expression de Bfl-1 et que seule la protéine Tax augmente celle de Bcl-x_L.

2 – 1/ Régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ

L'ensemble des travaux réalisés lors de cette thèse ont montré que l'oncoprotéine Tax induit l'expression endogène de Bfl-1 et augmente celle de Bcl-x_L dans différents modèles de lignées cellulaires ou de cellules primaires. Nos résultats sont renforcés par les travaux de M. Wencker qui a montré dans des thymocytes primaires humains transduits que Tax induit l'expression des transcrits de *bfl-1* (Villaudy et al., 2011) et augmente celle des transcrits de *bcl-x_L* (Wencker, 2009), mais pas celle de *bcl-2* (Villaudy et al., 2011).

Nos travaux et ceux décrits dans la littérature indiquent que Tax active la transcription des gènes *bfl-1* et *bcl-x_L* via la voie NF-κB (de la Fuente et al., 2003; Mori et al., 2001). Cependant, nos travaux montrent pour la première fois l'implication de la voie NF-κB classique dans la transactivation du gène *bfl-1* par Tax. Nos résultats indiquent également que d'autres voies sont impliquées dans la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par Tax. Cette hypothèse est renforcée par des résultats préliminaires que nous avons obtenus en collaboration avec F. Bex (Belgique) utilisant des mutants de Tax incapables d'activer la voie NF-κB classique (résultats non montré).

Quels autres facteurs de transcription pourraient potentiellement être impliqués dans la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par Tax ? Il est décrit dans la littérature que Tax active la voie NF-κB alterne (Peloponese et al., 2006) et que l'engagement de CD40, un activateur de la voie NF-κB alterne, induit l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans des cellules B (Lee et al., 1999). Il serait donc intéressant d'explorer l'implication de la voie NF-κB alterne dans la *trans*-activation des gènes codant pour Bfl-1 et Bcl-x_L par Tax. Dans le but de discriminer le rôle précis des deux voies NF-κB classique et alterne dans l'activation de l'expression de Bfl-1 ou de Bcl-x_L par Tax, l'utilisation d'un shARN dirigé contre des membres spécifiques des voies NF-κB classique ou alterne après transfection de Tax dans les cellules HeLa pourrait être envisagée. Par exemple, la répression de IKKβ permettrait d'évaluer l'implication de la voie NF-κB classique, tandis que la répression de NIK permettrait d'évaluer celle de la voie NF-κB alterne.

Parmi les autres facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par Tax, nos résultats montrent pour la première fois que Tax coopère avec c-Jun et JunD, mais pas JunB, de la famille AP-1 pour activer la transcription de *bfl-1*. Des résultats similaires ont été obtenus pour *bcl-x_L*. De plus, nos données illustrent le fait que la régulation de l'expression de Bfl-1 se distingue de celle de Bcl-x_L puisque c-Jun seul est capable d'augmenter le taux de transcription de *bfl-1*, mais pas celui de *bcl-x_L*.

L'ensemble de ces données montre que Tax active l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L via les voies NF-κB et AP-1. Il a été décrit que le mutant M22 de Tax (Tax-M22) n'active ni un promoteur artificiel de la voie NF-κB ni un promoteur contenant des sites consensus AP-1 (*Peloponese and Jeang, 2006*). Nous avons montré que Tax-M22 active partiellement la transcription de *bfl-1* et de *bcl-x_L* par comparaison à Tax-WT. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs de transcription, différents des facteurs NF-κB et AP-1 soient impliqués dans l'induction de l'expression de Bfl-1 et Bcl-x_L par Tax. Par exemple, les gènes *bfl-1* (*Nieborowska-Skorska et al., 2002*) et *bcl-x_L* (*Socolovsky et al., 1999*) sont deux cibles du facteur de transcription STAT5. Sachant que Tax active l'expression de STAT5 (*Nakamura et al., 1999*), il serait intéressant d'étudier la capacité de Tax à activer l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L via ce facteur de transcription. Ces études pourraient être réalisées par l'analyse de l'activité du promoteur de *bfl-1* ou la mesure du taux de transcrits de *bfl-1* et de *bcl-x_L* après transfection de vecteurs exprimant Tax et/ou STAT5 dans les cellules HeLa ou Jurkat. Des inhibiteurs de la voie STAT ou un shARN dirigé contre STAT5 pourraient également être utilisés après transfection d'un vecteur exprimant Tax dans ces mêmes cellules.

Un autre mécanisme par lequel Tax pourrait réguler l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L au cours du développement de l'ATLL serait la régulation par les microARN (miARNs ou miR). Des études récentes montrent que les miARNs sont dérégulés chez les patients atteints d'ATLL (*Bellon et al., 2009; Pichler et al., 2008; Ruggero et al., 2010; Yeung et al., 2008*). Comme l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bcl-x_L, peut être régulée par les miARNs dans différents cancers, nous pouvons supposer que les cellules d'ATLL pourraient présenter une dérégulation de l'expression de miARNs en faveur de l'expression de Bfl-1 ou de Bcl-x_L. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord réalisé une analyse *in silico* à l'aide de logiciels, dont Target Scan (Sanger). Il en ressort

qu'une dizaine de miARNs sont susceptibles d'interagir avec la région 3'UTR de *bfl-1* et une centaine de miARNs avec celle de *bcl-x_L*. Le fait que peu de miARNs soient potentiellement capables de lier la région 3'-UTR de *bfl-1* n'est pas surprenant puisque la région 3'-UTR de *bfl-1* est bien plus courte que celle de *bcl-x_L*. Pour valider nos données obtenues *in silico*, nous avons initié une collaboration avec E. Ricci de l'équipe T. Ohlmann (Lyon). Ainsi, les régions 3'-UTR de *bfl-1* et de *bcl-x_L* ont déjà été clonées en amont du gène de la luciférase dans l'objectif d'évaluer le rôle direct des miARNs sur la régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L. L'impact de ces miARNs sur la survie de cellules T infectées par HTLV-1 ainsi que sur l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourrait également être évalué, après expression de ces miARNs, de leur mimétiques ou d'antagomirs. Les antagomirs sont des petits ARN synthétiques qui sont parfaitement complémentaires à leurs miARNs cibles et inhibent la maturation de ces derniers. Un miARN révélé par notre étude *in silico* retient notre attention : il s'agit de Let-7. En effet, ce dernier est réprimé dans les lignées cellulaires dérivées de patients atteints d'ATLL (Yeung *et al.*, 2008). Comme Let-7 a été décrit comme répresseur de l'expression de Bcl-x_L dans des lignées cellulaires d'hépatome (Shimizu *et al.*, 2010), nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la dérégulation de Let-7 soit responsable de la surexpression de Bcl-x_L dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, voire dans les cellules d'ATLL. Par ailleurs, en plus des miARNs capables d'inhiber l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, il existe des miARNs impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Ces derniers sont dits oncomir lorsqu'ils sont associés à un cancer. Ils pourraient alors favoriser l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bfl-1 et Bcl-x_L. Il a d'ailleurs été décrit qu'un mimétique de mir-146a induit l'expression de Bcl-x_L dans une lignée de cellules épithéliales humaine de bronches (Liu *et al.*, 2009). Par conséquent, miR-146a pourrait être spécifique d'un répresseur de l'expression de Bcl-x_L et favoriser de manière indirecte l'expression de Bcl-x_L. De façon intéressante, miR-146a est surexprimé dans les cellules d'ATLL et les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et induit la croissance des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 (Tomita *et al.*, 2009). Comme l'expression de miR-146a est également induite par Tax (Pichler *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2009), il semble intéressant d'étudier la capacité de Tax à moduler l'expression de miARNs, dont miR-146a, pour augmenter l'expression de Bcl-x_L. Après avoir optimisé la mise au point de l'extraction des miARNs dans les cellules de patients atteints d'ATLL, le niveau d'expression des miARN identifiés *in silico* sera évalué dans les

cellules d'ATLL par microarray. L'expression des miARN ainsi identifiés sera confirmée par RT-PCR en temps réel. Après avoir validé la capacité de ces miARNs à réprimer ou à favoriser l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L, l'identification des voies de signalisation et des protéines virales en amont de l'expression de ces miARNs pourra être évaluée par des essais luciférase après clonage des promoteurs des miARNs en amont du gène de la luciférase. L'ensemble de ce projet pourrait apporter des explications nouvelles à la compréhension des mécanismes de survies cellulaires favorisés suites à l'infection par HTLV-1, d'autant plus qu'aucun miARN spécifique de Bfl-1 n'a été décrit dans la littérature. Les perspectives présentées ci-dessus ne sont que quelques exemples parmi d'autres expliquant les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par Tax.

Si Tax active l'expression des gènes *bfl-1* et *bcl-x_L*, la protéine HBZ, lorsqu'elle est exprimée seule, ne module pas l'expression de Bfl-1 ni celle de Bcl-x_L. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que HBZ est uniquement fonctionnelle sous forme d'hétérodimères constitués principalement de membres de la famille AP-1, comme JunB, c-Jun ou JunD (Basbous et al., 2003; Reinke et al., 2010; Thebault et al., 2004). Nous avons démontré que HBZ coopère avec JunD pour activer le promoteur de *bfl-1*. En revanche, HBZ réprime l'activation du promoteur de *bfl-1* induite par c-Jun de manière dose-dépendante. Comme la protéine JunD, mais pas c-Jun, est retrouvée exprimée et active dans cellules d'ATLL (Mori et al., 2000; Nakayama et al., 2008), le dimère HBZ/JunD pourrait induire l'expression de Bfl-1. Une fois de plus, Bfl-1 se distingue de Bcl-x_L puisque l'expression de Bcl-x_L n'est pas modulée par HBZ, même en présence de c-Jun ou de JunD. Ces données indiquent que HBZ pourrait maintenir l'expression de Bfl-1, mais pas celle de Bcl-x_L, dans les cellules d'ATLL n'exprimant pas Tax.

Comme Tax et HBZ sont co-exprimées dans les cellules infectées par HTLV-1 chez les individus asymptomatiques et au cours de l'ATLL, nous avons également étudié la résultante de l'expression simultanée de Tax et de HBZ sur l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans des cellules T exprimant stablement ces deux protéines virales. Nous avons montré que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées dans les cellules T Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ, mais pas dans les cellules T Jurkat parentales. Afin de démontrer que les facteurs cellulaires (NF-κB, c-Jun et JunD) et potentiellement viraux (Tax et HBZ) se fixent sur le promoteur de *bfl-1*, des

essais de gel retard sont actuellement en cours (collaboration avec V. Moncollin de l'équipe de L. Schaeffer, Lyon). Cette étude est réalisée dans les cellules T exprimant stablement Tax et HBZ et permettra de mettre en évidence la présence des facteurs NF- κ B (RelA, RelB, c-Rel, p50 et p52), des facteurs c-Jun, JunD et éventuellement des protéines virales Tax et HBZ sur le promoteur de *bfl-1*. Nous avons choisi d'étudier en particulier la région -123/-24 du promoteur de *bfl-1* car un site NF- κ B et deux sites AP-1 ont été décrits dans cette partie du promoteur (D'Souza *et al.*, 2004). De plus, des expériences préliminaires de gel retard montrent que cette région du promoteur de *bfl-1* est activée dans les cellules T exprimant stablement Tax et HBZ. Dans le noyau, Tax ne se lie pas directement à l'ADN mais interagit avec des facteurs de transcription capables d'activer le promoteur des gènes cibles. Aussi, la présence de Tax sur le promoteur de *bfl-1* nous permettrait de proposer que Tax recrute directement ces facteurs de transcription sur le promoteur de *bfl-1* dans le noyau. Tax active également les facteurs de transcription de manière indirecte en activant des voies de signalisation en amont dans le cytoplasme. Par conséquent, l'absence de Tax sur le promoteur de *bfl-1* suggérerait que l'expression de Bfl-1 résulte de l'activation des voies NF- κ B et AP-1 par Tax dans le cytoplasme.

Enfin, comme l'expression de Tax décroît au cours du développement de l'ATLL, mais pas celle de HBZ, nous avons mimé l'expression de ces deux protéines virales à différents rapport HBZ/Tax. Nous avons ainsi montré que HBZ réprime la coopération de Tax et c-Jun et favorise celle de Tax et JunD pour activer le promoteur de *bfl-1* de manière dose-dépendante. Ces résultats démontrent donc pour la première fois la capacité de HBZ à inhiber ou à favoriser la capacité de Tax à augmenter l'expression des gènes anti-apoptotiques. Par ailleurs, l'expression simultanée de HBZ et JunD ou de HBZ, Tax et JunD (avec un rapport HBZ/Tax élevé) active faiblement le promoteur de *bfl-1* par comparaison à la co-expression de Tax et JunD ou de HBZ, Tax et JunD (avec un rapport HBZ/Tax faible). Par conséquent, il semblerait que **l'effet de Tax sur l'activation de l'expression de Bfl-1 soit majoritaire et dominant par comparaison à celui de HBZ**. Comme HBZ n'active pas l'expression de Bcl-x_L, l'ensemble de nos résultats suggère que Bfl-1 et Bcl-x_L sont majoritairement exprimées dans les cellules d'ATLL exprimant Tax.

2 – 2/ Implication potentielle de Mcl-1 dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1 ?

Tout au long de mes travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude des protéines anti-apoptotiques Bfl-1, Bcl-x_L et Bcl-2. Nos résultats ont montré que Bfl-1 et Bcl-x_L, mais pas Bcl-2, sont régulées par les protéines virales Tax et/ou HBZ et jouent un rôle dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. En fin de thèse, j'ai commencé à m'intéresser à Mcl-1, un autre membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, qui est surexprimé dans des hémopathies, comme les myélomes multiples et la leucémie myéloïde chronique. Nos données indiquent une forte expression de Mcl-1 dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et dans les cellules T exprimant stablement Tax et HBZ par rapport aux lignées cellulaires T non infectées (résultats non montrés). Nos résultats et ceux de M. Wencker montrent respectivement que l'expression transitoire de Tax dans les cellules HeLa et dans des thymocytes primaires humains augmente le niveau des transcrits de *mcl-1* (résultats non montrés et Wencker, 2009). Ces observations sont renforcées par l'étude de Swaims *et al.* montrant l'augmentation de l'expression de Mcl-1 dans des cellules T CD4⁺ issues de souris transgéniques LTR-Tax stimulées *ex vivo* par comparaison à des cellules T CD4⁺ de souris contrôles (Swaims *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier le rôle de Mcl-1 dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 par ARN interférence pour déterminer si Mcl-1 représente un gène de survie, au même titre que Bfl-1 et Bcl-x_L. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent que Mcl-1 est potentiellement un autre gène de survie dans certaines lignées T infectées par HTLV-1. En particulier, la lignée cellulaire T MT-2 infectée par HTLV-1 est sensible à la mort induite par la répression de Bcl-x_L par ARN interférence, mais pas à celle induite par l'invalidation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-2. De façon surprenante, les cellules MT-2 sont moins sensibles à la mort induite par l'ABT-737 que les autres cellules T infectées par HTLV-1 qui sont sensibles à la fois à la mort cellulaire induite par l'invalidation de Bcl-x_L et à celle de Bfl-1 par ARN interférence. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats, l'une impliquant Mcl-1 et l'autre Bfl-1. En effet, Mcl-1 pourrait être impliquée dans la survie des cellules MT-2. Les données de la littérature renforcent cette première hypothèse puisque les inhibiteurs oridonin, celecoxib et AZ960, qui induisent la mort des lignées cellulaires T

infectées par HTLV-1, inhibent l'expression de Mcl-1 (*Ikezoe et al., 2005; Sinha-Datta et al., 2008; Yang et al., 2010*). Il serait alors judicieux d'étudier dans un premier temps l'impact de Mcl-1 dans la survie des cellules MT-2 par ARN interférence, puis dans un second temps de combiner le traitement de l'ABT-737 avec un shARN dirigé contre Mcl-1. La deuxième hypothèse serait que Bfl-1 ne soit pas directement impliquée dans la survie des cellules MT-2, mais plutôt dans la résistance à la mort cellulaire induite par l'ABT-737. Pour démontrer cette hypothèse, il serait intéressant de réprimer simultanément l'activité de Bcl-x_L par l'ABT-737 et l'expression de Bfl-1 par ARN interférence et d'analyser les conséquences sur la survie des cellules MT-2.

2 – 3/ Rôle complémentaire de Tax et de HBZ au cours du développement de l'ATLL

Dans une lignée cellulaire T exprimant stablement Tax et HBZ, nous avons également montré que l'inhibition de l'expression de Tax par ARN interférence est corrélée à l'inhibition partielle de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L et conduit à la mort spontanée et partielle de cette lignée. Ces données indiquent que **ces deux protéines anti-apoptotiques participent à l'activité anti-apoptotique de Tax**. Contrairement à l'inhibition de l'expression de Tax, celle de HBZ n'induit pas la mort des cellules T exprimant stablement Tax et HBZ (résultats non montrés). En revanche, nous avons observé une diminution du nombre de cellules lorsque l'expression de HBZ était invalidée par ARN interférence, confirmant le rôle de HBZ plutôt dans la prolifération cellulaire que dans la survie cellulaire (résultats non montrés). En effet, Satou *et al.* ont été les premiers à décrire la capacité de HBZ à favoriser la prolifération cellulaire en *trans*-activant des gènes impliqués dans ce processus, comme le gène *E2F1* (*Satou et al., 2006*). Le fait que HBZ joue un rôle dans la prolifération et non dans la survie cellulaire est cohérent avec le fait que HBZ induit faiblement l'expression de Bfl-1 via le dimère HBZ/JunD et n'active pas l'expression de Bcl-x_L. Nous pouvons donc supposer que le dimère HBZ/JunD jouerait plutôt un rôle dans la régulation de l'expression de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, comme hTERT, et donc dans l'activation de

l'expression de Bfl-1 si ce dernier joue un rôle dans la prolifération des cellules infectées par HTLV-1.

Comme Tax est impliquée au moins dans la survie et HBZ plutôt dans la prolifération des cellules infectées par HTLV-1, les deux protéines virales Tax et HBZ peuvent avoir une activité fonctionnelle cellulaire complémentaire. En effet, Tax favorise à la fois la survie, la prolifération et l'instabilité génétique des cellules T infectées par HTLV-1. L'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L induite par Tax serait alors un des mécanismes favorisant la survie des cellules T infectées par HTLV-1, ce qui permettrait alors la persistance des cellules infectées dans l'organisme. De plus, en facilitant la survie des cellules endommagées par des modifications génétiques, Tax permet l'émergence de cellules précancéreuses. Ainsi, Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient favoriser la survie des cellules T infectées par HTLV-1 endommagées et conduire à l'initiation du processus leucémogène. Le maintien de la survie des cellules précancéreuses permet à ces dernières l'acquisition de nouvelles modifications génétiques conduisant à la transformation en cellules cancéreuses. Comme décrit par Hanahan *et al.*, les cellules cancéreuses sont de manière générale résistantes aux signaux de mort et capables de proliférer de manière autonome. Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, le rôle de HBZ serait alors d'amplifier le phénomène d'expansion clonale en augmentant le taux de prolifération de cellules cancéreuses déjà résistantes à la mort cellulaire. L'activité pro-proliférative de HBZ pourrait impliquer Bfl-1 puisque ce dernier joue un rôle dans la prolifération cellulaire (*D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998; Zhou et al., 2007*) et que son expression peut être induite par le dimère HBZ/JunD. La complémentarité entre les deux protéines virales s'illustre également par la régulation de l'expression de hTERT. En réprimant hTERT dans les cellules T non cancéreuses infectées par HTLV-1 et au cours des étapes pré-leucémiques, Tax favoriserait l'instabilité génétique nécessaire à l'initiation de la leucémogénèse. Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, HBZ induit l'expression de hTERT permettant le maintien de l'intégrité des chromosomes nécessaire à l'immortalisation (*Kuhlmann et al., 2007*).

En conclusion, mon travail de thèse portant sur la régulation de Bfl-1 et de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ a permis de démontrer le rôle prépondérant de Tax sur l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L. Nos résultats suggèrent que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées

au cours des étapes précoces et des étapes tardives du développement de l'ATLL lorsque Tax est exprimée. Par conséquent, Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient jouer un rôle essentiel dans le processus d'initiation de la leucémogenèse et potentiellement dans la survie et/ou la prolifération des cellules d'ATLL. Par ailleurs, l'implication d'autres voies de signalisation potentiellement impliquées dans la *trans*-activation de Bfl-1 et de Bcl-x_L par Tax reste à explorer, ainsi que le rôle potentiel de Mcl-1 dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.

3/ MODELE PRESENTANT L'EXPRESSION ET LE ROLE DANS LA SURVIE CELLULAIRE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BFL-1 ET BCL-X_L AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ATLL

Comme nous l'avons vu précédemment, Tax et HBZ sont exprimées au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL (Figure 52A). Nos résultats montrent que Tax induit l'expression de Bfl-1 et augmente celle de Bcl-x_L dans des cellules T infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax et HBZ. Si la protéine virale HBZ seule n'a pas d'effet sur l'expression des protéines anti-apoptotiques, elle peut dans certaines conditions amplifier l'expression de Bfl-1 induite par Tax et JunD. Par conséquent, **nous pouvons supposer que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées dans les cellules infectées par HTLV-1 au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL (Figure 52C gauche).** Comme Bfl-1 et Bcl-x_L sont impliquées dans la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, nous pouvons émettre l'hypothèse que Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient favoriser la survie des cellules T infectées par HTLV-1 et, comme nous l'avons vu précédemment, favoriser l'émergence de cellules précancéreuses en induisant la survie de cellules T infectées par HTLV-1 ayant acquis des altérations génétiques (Figure 52C gauche). De cette manière, Bfl-1 et Bcl-x_L pourraient être impliquées dans l'initiation de la leucémogenèse médiée par Tax.

Afin de déterminer l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, nous avons établi une collaboration avec O. Hermine pour rechercher le niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques dans des échantillons de

cellules de patients atteints d'une des quatre formes de l'ATLL. Après avoir tenté d'explorer l'expression des protéines anti-apoptotiques au niveau messager, nous avons recherché leur expression au niveau protéique. A ce jour, seuls deux échantillons présentaient suffisamment de matériel pour la réalisation d'un immunoblot. Sur ces deux échantillons correspondant à des patients atteints de la forme aiguë ou chronique, une expression positive de Bfl-1 a été détectée. Un de ces patients exprime fortement Tax. Cependant, nous n'avons pas encore déterminé l'expression de Tax dans le deuxième échantillon, ni de HBZ et de Bcl-x_L pour corréler l'expression des protéines anti-apoptotiques à celle des protéines virales chez ces deux patients. Ces données préliminaires confortent l'idée selon laquelle Bfl-1 peut être exprimée par les cellules infectées par HTLV-1 chez les individus atteints d'ATLL. L'étude d'une cohorte plus importante nous permettra donc de valider si Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées et si leur expression est corrélée à celle de Tax.

Nous pouvons déjà émettre trois hypothèses concernant l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans les étapes tardives du développement de l'ATLL. Comme Tax induit l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L, la première hypothèse est que **Bfl-1 et/ou Bcl-x_L seraient exprimées au cours des étapes tardives de l'ATLL lorsque Tax est exprimée** (Figure 52B hypothèse 1). Ainsi, l'expression de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L induite par Tax pourrait favoriser la survie des cellules d'ATLL exprimant Tax (Figure 52C droite). Cependant, la proportion de cellules de patients atteints d'ATLL exprimant Tax est controversée. Des études montrent qu'une majorité des échantillons d'ATLL expriment Tax au niveau messager (*Ishikawa et al., 2010; Nagakubo et al., 2007; Usui et al., 2008*), alors que d'autres indiquent qu'une majorité de patients atteints d'ATLL ne l'expriment pas (*Nakayama et al., 2008; Satou et al., 2006; Takeda et al., 2004*). Est-ce que cette variabilité pourrait être due aux différents sous-types de l'ATLL ? C'est d'ailleurs pour répondre à cette question que nous nous attachons à explorer l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L et des protéines virales Tax et HBZ dans les quatre sous-types de l'ATLL.

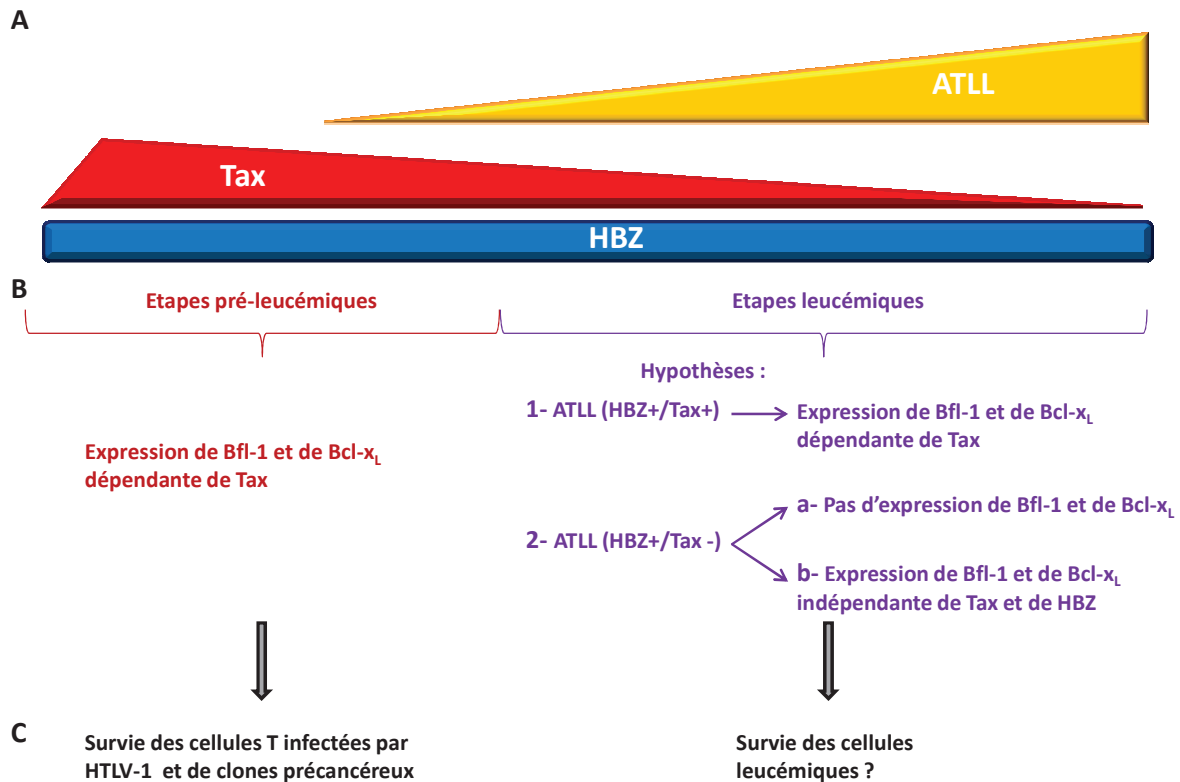


Figure 52: Modèle présentant l'expression et le rôle dans la survie cellulaire des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L au cours du développement de l'ATLL

(A) La protéine virale Tax est exprimée suite à l'infection par HTLV-1 et au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL. L'expression de Tax décroît au cours du développement de l'ATLL et peut être indétectable chez certains cas d'ATLL. L'expression de HBZ est observée à tous les stades de l'ATLL et chez tous les patients atteints d'ATLL. (B) Modèle d'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L au cours du développement de l'ATLL. Au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL, Tax induit l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L. Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, trois hypothèses sont présentées. Dans les cellules d'ATLL exprimant Tax, Tax induirait l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L (1). Dans les cellules d'ATLL n'exprimant pas Tax, Bfl-1 et Bcl-x_L ne seraient pas exprimées (2a) ou seraient exprimées de manière indépendante des protéines virales (2b). (C) Rôle de Bfl-1 et de Bcl-x_L dans les cellules infectées par HTLV-1 au cours du développement de l'ATLL. Les protéines Bfl-1 et Bcl-x_L joueraient un rôle dans la survie des cellules infectées lorsqu'elles sont exprimées. En permettant la survie d'un ou plusieurs clone(s) endommagé(s), Bfl-1 et Bcl-x_L favoriseraient l'émergence de cellules précancéreuses. Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL, dans le cas où Bfl-1 et Bcl-x_L seraient exprimées, ces dernières favoriseraient la survie des cellules tumorales. Dans le cas où Bfl-1 et Bcl-x_L ne seraient pas exprimées, les cellules tumorales auraient acquis des altérations génétiques impliquées dans la résistance aux signaux de mort.

Au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL et dans les cas d'ATLL où l'expression de Tax n'est pas détectée, deux hypothèses concernant l'expression de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L peuvent être proposées. L'une serait que **Bfl-1 et Bcl-x_L ne sont pas**

exprimées au cours des étapes tardives de l'ATLL et n'ont pas d'activité anti-apoptotique (Figure 52B hypothèse 2a). Les cellules leucémiques auraient développé des mécanismes permettant leur survie de manière indépendante de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L, comme des modifications génétiques et épigénétiques conduisant à l'activation constitutive des voies de survie. Une autre hypothèse serait que **Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées au cours des étapes tardives de l'ATLL de manières indépendantes de l'expression de Tax et de HBZ, voire de l'ensemble des protéines virales** (Figure 52A et B hypothèse 2b). Un argument en faveur de cette dernière hypothèse est que des lignées cellulaires dérivées de cellules d'ATLL, comme les cellules TL-Om1 et ED-40515, n'expriment pas Tax, mais expriment HBZ et Bcl-x_L (Mori et al., 2001; Sanda et al., 2006). Comme HBZ n'active pas l'expression de Bcl-x_L, l'expression de Bcl-x_L serait indépendante de Tax et de HBZ dans ces lignées cellulaires. Il serait donc intéressant de déterminer le niveau d'expression de Bfl-1 dans ces cellules. L'expression de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L au cours des étapes tardives du développement de l'ATLL pourrait alors être liée à des modifications génétiques ou épigénétiques, ou encore résulter de l'activation constitutive de la voie NF-κB et du facteur JunD, indépendamment de Tax et de HBZ (Mori et al., 2000). Une autre possibilité que nous avons déjà présentée serait la dérégulation de l'expression des miARN en faveur de celle de Bfl-1 et de Bcl-x_L.

En conclusion, nous avons proposé dans ce modèle que Bfl-1 et Bcl-x_L jouent un rôle dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1. Nous avons également émis l'hypothèse que Bfl-1 et Bcl-x_L puissent être exprimées dans les cellules d'ATLL exprimant ou n'exprimant pas Tax. L'étude de l'expression de Bfl-1, de Bcl-x_L et de Tax dans une cohorte plus importante de cellules de patients atteints d'ATLL est nécessaire pour valider l'une de nos trois hypothèses. Enfin, nos résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que Bfl-1 et Bcl-x_L représenteraient des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter l'ATLL. Une des stratégies envisageable pour réprimer Bfl-1 et Bcl-x_L est d'inhiber les voies de signalisation en amont des deux protéines anti-apoptotiques. D'ailleurs, une approche a été de traiter des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 avec des inhibiteurs de la voie NF-κB classique. Ainsi, Bay11-7082, un inhibiteur de la voie NF-κB classique, induit la mort de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 et des cellules d'ATLL (Agbottah et al., 2008; Mori et al., 2002). Cependant, nous pensons que la voie NF-κB ne représente pas une cible

thérapeutique intéressante pour plusieurs raisons. La voie NF- κ B est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que l'angiogenèse. Le fait de cibler une voie de signalisation régulant l'expression de nombreuses protéines peut être toxique sur des cellules saines. C'est en effet ce qu'un autre groupe et nous même avons démontré ((*Agbottah et al., 2008*) et résultats non montrés). La lignée cellulaire T non infectée Jurkat, qui n'exprime pas Bfl-1 et Bcl-x_L, est fortement sensible à la mort cellulaire induite par Bay11-7082. A ces mêmes concentrations de Bay11-7082, nous avons observé que l'inhibiteur induit une mort partielle des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Cette dernière donnée est en accord avec le fait que le traitement avec l'inhibiteur Bay11-7082 induit une inhibition partielle de l'expression de Bfl-1 et Bcl-x_L dans ces cellules. En revanche, le fait de cibler spécifiquement et simultanément Bfl-1 et Bcl-x_L favorise la mort des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, mais pas des lignées cellulaires T non infectées. Par conséquent, nous proposons de cibler directement Bfl-1 et/ou Bcl-x_L, plutôt que d'utiliser des inhibiteurs des voies de signalisation affectant de nombreuses protéines, pour traiter efficacement les patients atteints d'ATLL.

4/ IDENTIFICATION DE PETITES MOLECULES A VISEE THERAPEUTIQUE DIRIGEEES CONTRE BFL-1

Les cancers sont des pathologies complexes caractérisées par des altérations génétiques perturbant entre autres le profil d'expression des protéines cellulaires. Il est établi que la surexpression de protéines anti-apoptotiques, comme les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, confère aux cellules cancéreuses la capacité à résister aux signaux de mort, une caractéristique des cellules tumorales (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Les inhibiteurs spécifiques des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont déjà prouvé leur efficacité à inhiber la progression tumorale et à limiter les phénomènes de chimiorésistance au cours d'essais cliniques. Toutefois, chaque pathologie est différente du fait que les altérations génétiques varient en fonction du type de cancer, de l'état d'avancement de la pathologie et de chaque individu. De nombreuses molécules ont été développées contre l'activité des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Certaines

inhibent l'ensemble de membres de la famille Bcl-2 et sont dites pan-Bcl-2, alors que d'autres inhibent préférentiellement avec une forte affinité l'activité d'un ou de quelques membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et sont considérées comme spécifiques de ces derniers. Ces molécules occupent la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et bloquent l'interaction entre les membres anti-apoptotiques et leurs ligands pro-apoptotiques. Ces derniers peuvent alors restaurer l'apoptose.

Compte tenu de nos résultats, nous proposons que des molécules spécifiques de Bfl-1 et/ou de Bcl-x_L pourraient représenter des outils intéressants pour le traitement de l'ATLL. Quand j'ai commencé ma thèse, aucune molécule spécifique de Bfl-1 ou capable de lier Bfl-1 avec une forte affinité n'avait été décrite. Depuis, deux types de molécules capables d'inhiber Bfl-1 ont été publiées. La molécule BI-97C1 est capable d'inhiber Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 et Bfl-1 avec des affinités comparables et représente donc un inhibiteur pan-Bcl-2 (*Wei et al., 2010*). Les N-aryl maleimides ont été identifiés comme des inhibiteurs potentiels de Bfl-1 à l'issue d'un crible de polarisation de la fluorescence haut débit réalisé avec Bfl-1 et un peptide correspondant au domaine BH3 de Bim. Parmi ces N-aryl maleimides, le composé 1 présente une IC₅₀ de l'ordre sur submicromolaire en polarisation de fluorescence (*Cashman et al., 2010*). Cependant, aucune donnée concernant la spécificité de ce composé vis-à-vis des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 n'est disponible. Par conséquent, aucune molécule spécifique de Bfl-1 n'a été identifiée à ce jour.

L'identification d'inhibiteurs spécifiques des protéines de la famille Bcl-2, basée sur une stratégie d'inhibiteurs d'interaction protéine/protéine, est l'une des stratégies actuelles pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques dans le domaine du cancer. Nous avons choisi d'utiliser la technologie AptaScreen® pour identifier des petites molécules organiques capables de rompre l'interaction de Bfl-1 avec un de ses ligands. Comme nous l'avons vu, l'expression du ligand par les levures est induite en même temps que l'ajout des molécules. Ainsi, cette technologie a permis d'identifier à la fois des molécules capables de rompre l'interaction Bfl-1/ligand et des molécules capables d'empêcher cette interaction sans être capable de rompre l'interaction une fois établie. Ces dernières ont donc une faible affinité vis-à-vis de Bfl-1. Notre projet de recherche à long terme consiste à identifier une molécule à visée thérapeutique capable de rompre l'interaction Bfl-1/protéine pro-

apoptotique de type BH3 qui est déjà établie dans les cellules cancéreuses. Cependant, isoler des molécules capables de lier Bfl-1 avec une faible affinité apporte des indications sur la nature des groupements chimiques pouvant se lier à Bfl-1. Ces informations peuvent être ensuite utilisées lors d'études de modélisations et être à la base de la recherche de petites molécules de deuxième génération plus affines.

Au sein de la société IMAXIO, nous avons réalisé deux cribles par la technologie Aptascreen® d'environ 60 000 molécules, dont 1 129 issues d'un crible *in silico*, capables d'empêcher l'interaction Bfl-1/Apt50 ou Bfl-1/Bim. 83 molécules ont alors été sélectionnées. Par des tests *in vitro* réalisés au laboratoire, 7 molécules ont finalement été retenues. Parmi ces molécules, la molécule IBF-18 induit la mort des lignées lymphoblastoïdes T viro-induite et des lignées lymphoblastoïdes B, mais pas des PBMC sains ou des lignées lymphoblastoïdes T n'exprimant pas Bfl-1.

Pour caractériser les molécules dirigées contre Bfl-1, le choix de contrôles permettant de valider la toxicité et la spécificité des molécules vis-à-vis de Bfl-1 est important. Dans notre cas, la toxicité a été validée sur des lignées cellulaires T non infectées n'exprimant pas Bfl-1, comme la lignée cellulaire Jurkat. Comme attendu, ces cellules ne se sont pas sensibles à la mort induite par la molécule IBF-18.

Pour déterminer la spécificité de la molécule IBF-18, nous avons analysé la corrélation entre la sensibilité des lignées cellulaires T infectées ou non par HTLV-1 à la mort induite par la molécule IBF-18 et celle induite par l'inactivation de l'expression de Bfl-1 par ARN interférence. Une telle corrélation a été observée pour chaque lignée cellulaire T testée, suggérant que la molécule IBF-18 est spécifique de Bfl-1 dans nos conditions. Pour cette raison, les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 représentent un bon modèle d'étude *in vitro* pour le développement des molécules dirigées contre Bfl-1.

Cependant, il est essentiel de valider aussi la toxicité des molécules dirigées contre Bfl-1 dans des cellules T exprimant Bfl-1 et pour lesquelles Bfl-1 n'est pas directement un gène de survie. Nous disposons au laboratoire de lignées cellulaires T infectées par HTLV-2 répondant à ces critères. En effet, lors de notre étude prospective sur l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, nous nous étions également intéressés à trois lignées cellulaires T infectées par

HTLV-2 (cellules MO, C344 et C19). Ces trois lignées expriment Bfl-1, Bcl-x_L et Bcl-2 (résultats non montrés).

Comme HTLV-1, HTLV-2 est un rétrovirus appartenant à l'espèce des PTLV. Le génome de HTLV-2 partage environ 65% d'homologie de séquence avec celui de HTLV-1 et code pour une protéine nommée Tax2, partageant quant à elle 78% d'homologie de séquence protéique avec la protéine Tax de HTLV-1 (*Feuer and Green, 2005*). Nous avons montré que l'expression ectopique de Tax2, comme celle de Tax, induit l'expression de Bfl-1 dans les cellules HeLa et augmente l'expression de Bcl-x_L, mais pas celle de Bcl-2 (résultats non montrés). Contrairement aux lignées cellulaires infectées par HTLV-1, l'inhibition de l'expression de Bfl-1 par ARN interférence ne sensibilise pas les cellules MO à la mort cellulaire spontanée. En revanche, les cellules MO sont sensibles à la mort induite par l'inhibition de l'expression de Bcl-2 ou de Bcl-x_L (résultats non montrés). Comme ces cellules expriment fortement Bfl-1 sans être sensibles à la répression de Bfl-1 par ARN interférence, nous avons exploré la sensibilité des cellules MO à la mort induite par la molécule IBF-18. Nos résultats montrent que les cellules MO sont résistantes à la mort cellulaire induite par la molécule IBF-18. De plus, ces cellules MO sont relativement résistantes à la mort induite par l'ABT-737 par comparaison aux lignées cellulaires infectées par HTLV-1 (résultats non montrés). Rappelons que l'ABT-737 cible préférentiellement Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w (*Oltersdorf et al., 2005*). Comme Bfl-1 et Mcl-1 sont impliquées dans la résistance à l'ABT-737 dans des lignées cellulaires de DLBCL (*Pandit and Gartel, 2010; van Delft et al., 2006; Vogler et al., 2009a; Yecies et al., 2010; Zall et al., 2010*) et que les cellules MO n'expriment pas Mcl-1 (résultats non montrés), nous avons supposé que Bfl-1 pouvait être impliquée dans la résistance à l'ABT-737 dans les cellules MO. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons alors traité les cellules MO avec une combinaison d'ABT-737 et de la molécule IBF-18. Une expérience préliminaire montre que la combinaison de ces deux molécules restaure presque totalement la mort de ces cellules (résultats non montrés). Ces données suggèrent que l'expression de Bfl-1 dans les cellules MO n'est pas nécessaire à leur survie si Bcl-x_L et Bcl-2 sont exprimées. En revanche, Bfl-1 pourrait jouer un rôle dans la survie des cellules MO suite à l'inhibition de l'activité de Bcl-x_L et de Bcl-2. Pour confirmer cette hypothèse, la sensibilité des cellules MO à la mort induite par la combinaison de l'ABT-737 et d'un shARN dirigé contre Bfl-1 pourrait être évaluée. Nous avons vu dans l'étude bibliographique que l'expression d'au moins un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 permet la survie

cellulaire. Par conséquent, et comme cela semble le cas pour les cellules MO, il est nécessaire de cibler l'ensemble des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 exprimées par la cellule pour induire une mort cellulaire efficace. L'ensemble de nos résultats suggère donc que les cellules MO représentent un bon modèle pour l'étude *in vitro* de l'effet de compensation entre les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 permettant la survie cellulaire ou la résistance aux agents cytotoxiques (ABT-737...) lorsqu'un (ou plusieurs) membre anti-apoptotique est inhibé.

L'ensemble de nos travaux a été réalisé avec des molécules de première génération. Ces molécules sont en général peu affines pour leur cible et présentent une activité de l'ordre du micromolaire. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé puisque la molécule IBF-18 induit la mort des cellules T MT-4, C91PL et HuT-102 infectées par HTLV-1 dès 3,2 μ M (résultats non montrés pour les cellules C91PL et HuT-102). Notre meilleur candidat dirigé contre Bfl-1 doit présenter une activité de l'ordre du nM dans les essais précliniques chez l'animal pour pouvoir entrer en essai clinique. En effet, les molécules ayant un effet de l'ordre du μ M sont généralement toxiques *in vivo*. Pour diminuer la toxicité des molécules, il est courant de modifier la structure chimique de la molécule pour augmenter son affinité et sa spécificité vis-à-vis de sa cible. En effet, une molécule efficace à de plus faibles doses est généralement moins toxique. Aussi, les molécules de première génération doivent être optimisées pour être plus affines et plus spécifiques. Les molécules optimisées sont des molécules de deuxième voire de troisième génération. Les 7 molécules (IBF-1, IBF-18, IBF-72, IBF-74, IBF-75, IBF80 et IBF-81) retenues après caractérisation *in vitro* ont donc servi de base à la recherche de petites molécules de deuxième génération par homologie de structure chimique à l'issue d'une étude *in silico* (collaboration B. Villoutreix, Paris). 346 molécules dérivées des molécules IBF-1, IBF-18, IBF-72, IBF-74, IBF-75, IBF80 et IBF-81 ont ainsi été isolées. Ces 346 molécules ont été testées dans un crible de petites molécules haut débit de polarisation de la fluorescence sur l'interaction Bfl-1/Bim (collaboration Benoît Deprez, Lille). Parmi les 346 molécules dérivées des molécules de première génération, 16 molécules de deuxième génération ont été identifiées à partir de ce dernier crible. Ces molécules de deuxième génération seront tout d'abord caractérisées *in vitro* par des tests biochimiques et fonctionnels et *in vivo* dans un modèle murin B. A moyen terme, les résultats obtenus avec

les molécules de deuxième génération serviront de base à l'identification de molécules de troisième génération optimisées par la technique SAR (pour **structure-activity relationship**). Cette technique permet d'étudier les relations entre la structure chimique des molécules et leur activité biologique. L'objectif étant d'identifier les groupements chimiques responsables de l'effet biologique. La modification de ces groupements chimiques permet ensuite d'augmenter l'effet ou la puissance d'un composé bioactif. Cette étude permettra d'isoler des molécules moins toxiques et plus actives répondant aux critères d'entrée en essais cliniques.

Pour l'étude *in vitro* des molécules de deuxième génération, un nouveau test biochimique ELISA, ainsi qu'une analyse de l'affinité des molécules vis-à-vis des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par la technique de Biacore, ont été mis au point au laboratoire en plus des tests déjà utilisés. Les molécules sélectionnées à l'issue des tests *in vitro* biochimiques seront évaluées dans des tests fonctionnels *in cellulo*, dont des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B. En effet, nous avons vu que Bfl-1 est impliquée dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques conventionnels dans des hémopathies B. Les molécules seront également caractérisées dans le modèle *in vitro* d'infection par HTLV-1 (lignées cellulaires T non infectées ou infectées par HTLV-2 par rapport aux lignées cellulaires T infectées par HTLV-1) selon la même approche méthodologique que nous avons développé précédemment. Si une ou deux de ces molécules se révèle spécifique de Bfl-1 et capable d'induire spécifiquement la mort des cellules T infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 contribue à leur survie, l'approche *in vivo* chez l'animal pourra alors être abordée.

La ou les deux meilleures molécules de deuxième génération validées *in vitro* seront évaluées *in vivo* quant à leur toxicité et leur efficacité à réduire la taille des tumeurs dans un modèle de xénogreffe de lignées lymphoïdes B chez la souris Nude, déjà disponible au laboratoire. Ces modèles de xénogreffes sont largement utilisés pour des études précliniques de nouvelles molécules thérapeutiques et ont prouvé leur efficacité, en particulier pour des molécules ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Oltersdorf et al., 2005; Trudel et al., 2007; Verhaegen et al., 2006). Dans le modèle d'infection par HTLV-1, plusieurs modèles existent déjà, dont les modèles de xénogreffe après injection de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Ces modèles de xénogreffe sont

également largement utilisés pour les études précliniques dans le cas de l'ATLL (*Zimmerman et al., 2010*). Comme ces modèles ne reflètent pas les symptômes de l'ATLL, nous avons choisi un modèle s'approchant le plus des symptômes de l'ATLL. Il s'agit du modèle Lck-Tax développé par Hasegawa *et al.*, bien que ces souris ne possèdent pas l'intégralité du génome viral (*Hasegawa et al., 2006*). Nous avons vu dans l'étude bibliographique que ces souris transgéniques Lck-Tax présentent des symptômes similaires à ceux de l'ATLL après une longue période de latence. Cependant, l'apparition de ces symptômes est plus rapide dans des souris SCID après transfert de splénocytes issues des souris transgéniques Lck-Tax (*Hasegawa et al., 2006*).

Pour valider la faisabilité de notre étude dans ce modèle murin transgénique Tax, il faudra tout d'abord s'assurer que les molécules dirigées contre Bfl-1 interagissent également avec A1, l'homologue murin de Bfl-1. Ensuite, nous devons vérifier que les splénocytes exprimant Tax avant transfert expriment A1. Une étude préliminaire sur la lignée B murine WEHI sur-exprimant la protéine A1 endogène a révélé deux molécules de première génération (IBF18 et IBF72 qui est issue du crible *in silico*) capables d'induire la mort de ces cellules (résultats non montrés). Dans ce contexte, une collaboration a été initiée avec A. Bazarbachi (Liban) et W. Hall (Irlande) pour valider l'expression de A1 dans le modèle murin Lck-Tax et pour évaluer la toxicité et l'efficacité des molécules dirigées contre Bfl-1 dans ce modèle.

De plus, le traitement des souris SCID avant transfert avec les molécules dirigées contre Bfl-1 ou/et l'ABT-737 permettra d'évaluer l'implication de A1/Bfl-1 ou/et de Bcl-x_L dans l'initiation de la leucémogenèse *in vivo*. Ce protocole a déjà été utilisé pour démontrer le rôle de Tax dans l'initiation de la leucémogenèse, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique (*El Hajj et al., 2010*). La capacité des molécules dirigées contre Bfl-1 à induire la régression des symptômes et à augmenter la durée de survie des souris sera explorée dans les souris SCID après transfert. L'effet des molécules dirigées contre Bfl-1 à bloquer l'évolution de la leucémie pourra ensuite être recherché *in vivo* en association avec des agents antiviraux ou chimiothérapeutiques conventionnels en plus de l'ABT-737. En effet, le traitement antiviral AZT/IFN- α représente l'une des meilleures stratégies actuelles pour le traitement des formes indolentes, chroniques et aiguës chez l'homme. En revanche, le traitement chimiothérapeutique semble être plus approprié pour le traitement de la forme lymphomateuse, qui ne répond pas aux traitements anti-viraux. Parmi les nombreuses

molécules de la combinaison LSG15, et après concertation avec O. Hermine (médecin à l'Hôpital Necker, Paris), la doxorubicine sera la molécule utilisée pour les essais *in vivo*. A long terme, si une molécule est retenue à l'issue de l'étude préclinique, et après avoir confirmé l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L sur un large panel de cellules de patients, une collaboration avec O. Hermine pourrait être envisagée pour des essais cliniques en vue de traiter l'ATLL.

5/ CONCLUSION

Ce travail de thèse nous a permis de proposer un modèle de régulation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ et de leur rôle dans la survie cellulaire au cours du développement de l'ATLL. Nos résultats montrent également pour la première fois que Bfl-1 et Bcl-x_L représentent des cibles thérapeutiques potentielles dans les cas de l'ATLL. Nos travaux ont permis d'identifier quelques molécules organiques dirigées contre Bfl-1 afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à inhiber l'activité anti-apoptotique de Bfl-1. Ces molécules de première génération seront à la base de futurs médicaments qui pourront être combinés aux traitements thérapeutiques déjà existant dans le cas de l'ATLL ou d'hémopathies B. La combinaison de drogues permet en effet de diminuer les doses de chacune d'elles et donc leur toxicité potentielle. A long terme, si une molécule passe les essais précliniques et cliniques, son application thérapeutique pourrait être étendue au traitement d'autres pathologies comme le lymphome d'Hodgkin (*Loughran et al., 2011*) ou encore des pathologies auto-immunes, comme le lupus (*Andre et al., 2007*), où Bfl-1 est fortement exprimée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adams, J.M., and S. Cory. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337.
- Afonso, P.V., A. Zamborlini, A. Saib, and R. Mahieux. 2007. Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology* 4:27.
- Agbottah, E., W.I. Yeh, R. Berro, Z. Klase, C. Pedati, K. Kehn-Hall, W. Wu, and F. Kashanchi. 2008. Two specific drugs, BMS-345541 and purvalanol A induce apoptosis of HTLV-1 infected cells through inhibition of the NF-kappaB and cell cycle pathways. *AIDS Res Ther* 5:12.
- Akagi, T., and K. Shimotohno. 1993. Proliferative response of Tax1-transduced primary human T cells to anti-CD3 antibody stimulation by an interleukin-2-independent pathway. *J Virol* 67:1211-1217.
- Andre, J., R. Cimaz, B. Ranchin, C. Galambrun, Y. Bertrand, R. Bouvier, F. Rieux-Laucat, M.C. Trescol-Biemont, P. Cochat, and N. Bonnefoy-Berard. 2007. Overexpression of the antiapoptotic gene Bfl-1 in B cells from patients with familial systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16:95-100.
- Anupam, R., A. Datta, M. Kesic, K. Green-Church, N. Shkriabai, M. Kvaratskhelia, and M.D. Lairmore. 2011. Human T-lymphotropic virus type 1 p30 interacts with REGgamma and modulates ATM (ataxia telangiectasia mutated) to promote cell survival. *J Biol Chem* 286:7661-7668.
- Arima, N., J.A. Molitor, M.R. Smith, J.H. Kim, Y. Daitoku, and W.C. Greene. 1991. Human T-cell leukemia virus type I Tax induces expression of the Rel-related family of kappa B enhancer-binding proteins: evidence for a pretranslational component of regulation. *J Virol* 65:6892-6899.
- Arnold, J., B. Yamamoto, M. Li, A.J. Phipps, I. Younis, M.D. Lairmore, and P.L. Green. 2006. Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* 107:3976-3982.
- Arnold, J., B. Zimmerman, M. Li, M.D. Lairmore, and P.L. Green. 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112:3788-3797.
- Avesani, F., M.G. Romanelli, M. Turci, G. Di Gennaro, C. Sampaio, C. Bidoia, U. Bertazzoni, and F. Bex. 2010. Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Virology* 408:39-48.
- Azmi, A.S., Z. Wang, R. Burikhanov, V.M. Rangnekar, G. Wang, J. Chen, S. Wang, F.H. Sarkar, and R.M. Mohammad. 2008. Critical role of prostate apoptosis response-4 in determining the sensitivity of pancreatic cancer cells to small-molecule inhibitor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:2884-2893.
- Azmi, A.S., Z. Wang, P.A. Philip, R.M. Mohammad, and F.H. Sarkar. 2011. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. *Expert opinion on emerging drugs* 16:59-70.
- Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, and M. Aboud. 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 1:20.
- Bai, X.T., H.H. Baydoun, and C. Nicot. 2010. HTLV-I p30: a versatile protein modulating virus replication and pathogenesis. *Mol Aspects Med* 31:344-349.
- Baines, C.P., R.A. Kaiser, T. Sheiko, W.J. Craigen, and J.D. Molkenstin. 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature cell biology* 9:550-555.
- Banerjee, P., L. Crawford, E. Samuelson, and G. Feuer. 2010. Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology* 7:8.

- Bangham, C.R. 2003. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *The Journal of general virology* 84:3177-3189.
- Barbeau, B., and J.M. Mesnard. 2007. Does the HBZ gene represent a new potential target for the treatment of adult T-cell leukemia? *International reviews of immunology* 26:283-304.
- Bardou, C., C. Borie, M. Bickle, B.B. Rudkin, and P. Colas. 2009. Peptide aptamers for small molecule drug discovery. *Methods Mol Biol* 535:373-388.
- Basbous, J., C. Arpin, G. Gaudray, M. Piechaczyk, C. Devaux, and J.M. Mesnard. 2003. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* 278:43620-43627.
- Basu, A., and S. Halder. 2003. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett* 538:41-47.
- Baud, V., and E. Jacque. 2008. [The alternative NF- κ B activation pathway and cancer: friend or foe?]. *Medecine sciences : M/S* 24:1083-1088.
- Baydoun, H.H., M. Bellon, and C. Nicot. 2008. HTLV-1 Yin and Yang: Rex and p30 master regulators of viral mRNA trafficking. *AIDS reviews* 10:195-204.
- Bazarghani, A., D. Ghez, Y. Lepelletier, R. Nasr, H. de The, M.E. El-Sabban, and O. Hermine. 2004. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. *The lancet oncology* 5:664-672.
- Bazarghani, A., Y. Plumelle, J. Carlos Ramos, P. Tortevoie, Z. Otroek, G. Taylor, A. Gessain, W. Harrington, G. Panelatti, and O. Hermine. 2010. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon- α in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol* 28:4177-4183.
- Bazarghani, A., F. Suarez, P. Fields, and O. Hermine. 2011. How I treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 118:1736-1745.
- Bellon, M., Y. Lepelletier, O. Hermine, and C. Nicot. 2009. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 113:4914-4917.
- Beroukhi, R., C.H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J.S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K.T. Mc Henry, R.M. Pinchback, A.H. Ligon, Y.J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M.S. Lawrence, B.A. Weir, K.E. Tanaka, D.Y. Chiang, A.J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F.J. Kaye, H. Sasaki, J.E. Tepper, J.A. Fletcher, J. Tabernero, J. Baselga, M.S. Tsao, F. Demichelis, M.A. Rubin, P.A. Janne, M.J. Daly, C. Nucera, R.L. Levine, B.L. Ebert, S. Gabriel, A.K. Rustgi, C.R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L.A. Garraway, M. Loda, D.G. Beer, L.D. True, A. Okamoto, S.L. Pomeroy, S. Singer, T.R. Golub, E.S. Lander, G. Getz, W.R. Sellers, and M. Meyerson. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463:899-905.
- Bex, F., K. Murphy, R. Wattiez, A. Burny, and R.B. Gaynor. 1999. Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation. *J Virol* 73:738-745.
- Bex, F., M.J. Yin, A. Burny, and R.B. Gaynor. 1998. Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol* 18:2392-2405.
- Bickle, M.B., E. Dusserre, O. Moncorge, H. Bottin, and P. Colas. 2006. Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nat Protoc* 1:1066-1091.
- Boise, L.H., M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C.B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.
- Boxus, M., J.C. Twizere, S. Legros, J.F. Dewulf, R. Kettmann, and L. Willems. 2008. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5:76.
- Boxus, M., and L. Willems. 2009. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *Br J Cancer* 101:1497-1501.

- Brauweiler, A., J.E. Garrus, J.C. Reed, and J.K. Nyborg. 1997. Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology* 231:135-140.
- Brien, G., A.L. Debaud, M. Bickle, M.C. Trescol-Biemont, O. Moncorge, P. Colas, and N. Bonnefoy-Berard. 2011. Characterization of peptide aptamers targeting Bfl-1 anti-apoptotic protein. *Biochemistry* 50:5120-5129.
- Brien, G., A.L. Debaud, X. Robert, L. Oliver, M.C. Trescol-Biemont, N. Cauquil, O. Geneste, N. Aghajari, F.M. Vallette, R. Haser, and N. Bonnefoy-Berard. 2009. C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J Biol Chem* 284:30257-30263.
- Brien, G., M.C. Trescol-Biemont, and N. Bonnefoy-Berard. 2007. Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene* 26:5828-5832.
- Buerger, C., and B. Groner. 2003. Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling. *Journal of cancer research and clinical oncology* 129:669-675.
- Buerger, C., K. Nagel-Wolfrum, C. Kunz, I. Wittig, K. Butz, F. Hoppe-Seyler, and B. Groner. 2003. Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *J Biol Chem* 278:37610-37621.
- Bultema, R., R. Longnecker, and M. Swanson-Mungerson. 2009. Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene* 28:1471-1476.
- Bushunow, P., M.M. Reidenberg, J. Wasenko, J. Winfield, B. Lorenzo, S. Lemke, B. Himpler, R. Corona, and T. Coyle. 1999. Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology* 43:79-86.
- Butz, K., C. Denk, B. Fitscher, I. Crnkovic-Mertens, A. Ullmann, C.H. Schroder, and F. Hoppe-Seyler. 2001. Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* 20:6579-6586.
- Butz, K., C. Denk, A. Ullmann, M. Scheffner, and F. Hoppe-Seyler. 2000. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6693-6697.
- Cartron, P.F., T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F.M. Vallette, and P. Juin. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular cell* 16:807-818.
- Cashman, J.R., M. MacDonald, S. Ghirmai, K.J. Okolotowicz, E. Sergienko, B. Brown, X. Garcia, D. Zhai, R. Dahl, and J.C. Reed. 2010. Inhibition of Bfl-1 with N-aryl maleimides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20:6560-6564.
- Cavanagh, M.H., S. Landry, B. Audet, C. Arpin-Andre, P. Hivin, M.E. Pare, J. Thete, E. Wattel, S.J. Marriott, J.M. Mesnard, and B. Barbeau. 2006. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* 3:15.
- Cavrois, M., S. Wain-Hobson, A. Gessain, Y. Plumelle, and E. Wattel. 1996. Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88:4646-4650.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S.A. Armstrong, and A. Letai. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* 9:351-365.
- Chen, L., S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* 17:393-403.
- Cheng, Q., H.H. Lee, Y. Li, T.P. Parks, and G. Cheng. 2000. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene* 19:4936-4940.

- Chiari, E., I. Lamsoul, J. Lodewick, C. Chopin, F. Bex, and C. Pique. 2004. Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol* 78:11823-11832.
- Ching, Y.P., A.C. Chun, K.T. Chin, Z.Q. Zhang, K.T. Jeang, and D.Y. Jin. 2004. Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology* 1:18.
- Chipuk, J.E., and D.R. Green. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* 18:157-164.
- Chipuk, J.E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, and D.R. Green. 2010. The BCL-2 family reunion. *Molecular cell* 37:299-310.
- Chlichlia, K., M. Busslinger, M.E. Peter, H. Walczak, P.H. Krammer, V. Schirmacher, and K. Khazaie. 1997. ICE-proteases mediate HTLV-I Tax-induced apoptotic T-cell death. *Oncogene* 14:2265-2272.
- Chlichlia, K., and K. Khazaie. 2010. HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem Biol Interact* 188:359-365.
- Chonghaile, T.N., and A. Letai. 2008. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 Suppl 1:S149-157.
- Ciminale, V., M. Hatziyanni, B.K. Felber, J. Bear, A. Hatzakis, and G.N. Pavlakis. 2000. Unusual CD4+CD8+ phenotype in a greek patient diagnosed with adult T-cell leukemia positive for human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Leukemia research* 24:353-358.
- Clerc, I., P. Hivin, P.A. Rubbo, I. Lemasson, B. Barbeau, and J.M. Mesnard. 2009. Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology* 391:195-202.
- Clerc, I., N. Polakowski, C. Andre-Arpin, P. Cook, B. Barbeau, J.M. Mesnard, and I. Lemasson. 2008. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem* 283:23903-23913.
- Colas, P., B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy, and R. Brent. 1996. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380:548-550.
- Cook, P.R., N. Polakowski, and I. Lemasson. 2011. HTLV-1 HBZ protein deregulates interactions between cellular factors and the KIX domain of p300/CBP. *Journal of molecular biology* 409:384-398.
- Copeland, K.F., A.G. Haaksma, J. Goudsmit, P.H. Krammer, and J.L. Heeney. 1994. Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1259-1268.
- Cross, A., R.J. Moots, and S.W. Edwards. 2008. The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. *Blood* 111:878-884.
- D'Agostino, D.M., P. Bernardi, L. Chieco-Bianchi, and V. Ciminale. 2005. Mitochondria as functional targets of proteins coded by human tumor viruses. *Advances in cancer research* 94:87-142.
- D'Sa-Eipper, C., and G. Chinnadurai. 1998. Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities. *Oncogene* 16:3105-3114.
- D'Souza, B.N., L.C. Edelstein, P.M. Pegman, S.M. Smith, S.T. Loughran, A. Clarke, A. Mehl, M. Rowe, C. Gelinas, and D. Walls. 2004. Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol* 78:1800-1816.
- Darwiche, N., A. Sinjab, G. Abou-Lteif, M.B. Chedid, O. Hermine, G. Dbaiibo, and A. Bazarbachi. 2011. Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling by everolimus induces senescence in adult T-cell leukemia/lymphoma and apoptosis in peripheral T-cell lymphomas. *Int J Cancer* 129:993-1004.
- Datta, A., L. Silverman, A.J. Phipps, H. Hiraragi, L. Ratner, and M.D. Lairmore. 2007. Human T-lymphotropic virus type-1 p30 alters cell cycle G2 regulation of T lymphocytes to enhance cell survival. *Retrovirology* 4:49.

- de Chassey, B., I. Mikaelian, A.L. Mathieu, M. Bickle, D. Olivier, D. Negre, F.L. Cosset, B.B. Rudkin, and P. Colas. 2007. An antiproliferative genetic screening identifies a peptide aptamer that targets calcineurin and up-regulates its activity. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6:451-459.
- de la Fuente, C., L. Wang, D. Wang, L. Deng, K. Wu, H. Li, L.D. Stein, T. Denny, F. Coffman, K. Kehn, S. Baylor, A. Maddukuri, A. Pumfery, and F. Kashanchi. 2003. Paradoxical effects of a stress signal on pro- and anti-apoptotic machinery in HTLV-1 Tax expressing cells. *Mol Cell Biochem* 245:99-113.
- DeLano, W.L. 2008. The PyMOL Molecular Graphics System. LLC. Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific.
- Deverman, B.E., B.L. Cook, S.R. Manson, R.A. Niederhoff, E.M. Langer, I. Rosova, L.A. Kulans, X. Fu, J.S. Weinberg, J.W. Heinecke, K.A. Roth, and S.J. Weintraub. 2002. Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 111:51-62.
- Du, H., J. Wolf, B. Schafer, T. Moldoveanu, J.E. Chipuk, and T. Kuwana. 2011. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem* 286:491-501.
- Duc Dodon, M., J.M. Mesnard, and B. Barbeau. 2010. [Adult T-cell leukemia induced by HTLV-1: before and after HBZ]. *Medecine sciences : M/S* 26:391-396.
- Durkin, S.S., M.D. Ward, K.A. Fryrear, and O.J. Semmes. 2006. Site-specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein. *J Biol Chem* 281:31705-31712.
- Edelstein, L.C., L. Lagos, M. Simmons, H. Tirumalai, and C. Gelinas. 2003. NF-kappa B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol Cell Biol* 23:2749-2761.
- Edgar, C.E., L.D. Lindquist, D.L. McKean, A. Strasser, and R.J. Bram. 2010. CAML regulates Bim-dependent thymocyte death. *Cell death and differentiation* 17:1566-1576.
- Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M.M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, and R.J. Youle. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145:104-116.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868.
- El Hajj, H., M. El-Sabban, H. Hasegawa, G. Zaatari, J. Ablain, S.T. Saab, A. Janin, R. Mahfouz, R. Nasr, Y. Kfoury, C. Nicot, O. Hermine, W. Hall, H. de The, and A. Bazarbachi. 2010. Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia. *The Journal of experimental medicine* 207:2785-2792.
- Etoh, K., S. Tamiya, K. Yamaguchi, A. Okayama, H. Tsubouchi, T. Ideta, N. Mueller, K. Takatsuki, and M. Matsuoka. 1997. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 57:4862-4867.
- Eychene, A., N. Rocques, and C. Pouponnot. 2008. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:683-693.
- Fan, G., M.J. Simmons, S. Ge, J. Dutta-Simmons, J. Kucharczak, Y. Ron, D. Weissmann, C.C. Chen, C. Mukherjee, E. White, and C. Gelinas. 2010. Defective ubiquitin-mediated degradation of antiapoptotic Bfl-1 predisposes to lymphoma. *Blood* 115:3559-3569.
- Ferrando, A.A., D.S. Neuberg, J. Staunton, M.L. Loh, C. Huard, S.C. Raimondi, F.G. Behm, C.H. Pui, J.R. Downing, D.G. Gilliland, E.S. Lander, T.R. Golub, and A.T. Look. 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* 1:75-87.
- Feuer, G., and P.L. Green. 2005. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24:5996-6004.
- Feuerhake, F., J.L. Kutok, S. Monti, W. Chen, A.S. LaCasce, G. Cattoretti, P. Kurtin, G.S. Pinkus, L. de Leval, N.L. Harris, K.J. Savage, D. Neuberg, T.M. Habermann, R. Dalla-Favera, T.R. Golub, J.C. Aster, and M.A. Shipp. 2005. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 106:1392-1399.

- Fu, D.X., Y.L. Kuo, B.Y. Liu, K.T. Jeang, and C.Z. Giam. 2003. Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 278:1487-1493.
- Fujii, M., K. Iwai, M. Oie, M. Fukushi, N. Yamamoto, M. Kannagi, and N. Mori. 2000. Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1603-1606.
- Fujii, M., T. Niki, T. Mori, T. Matsuda, M. Matsui, N. Nomura, and M. Seiki. 1991. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene* 6:1023-1029.
- Fujioka, S., J. Niu, C. Schmidt, G.M. Sclabas, B. Peng, T. Uwagawa, Z. Li, D.B. Evans, J.L. Abbruzzese, and P.J. Chiao. 2004. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24:7806-7819.
- Fukuda, R.I., K. Tsuchiya, K. Suzuki, K. Itoh, J. Fujita, A. Utsunomiya, and T. Tsuji. 2009. Human T-cell leukemia virus type I tax down-regulates the expression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate inositol phosphatases via the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 284:2680-2689.
- Furukawa, Y., R. Kubota, M. Tara, S. Izumo, and M. Osame. 2001. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 97:987-993.
- Gabet, A.S., F. Mortreux, P. Charneau, P. Riou, M. Duc-Dodon, Y. Wu, K.T. Jeang, and E. Wattel. 2003. Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* 22:3734-3741.
- Gallenne, T., F. Gautier, L. Oliver, E. Hervouet, B. Noel, J.A. Hickman, O. Geneste, P.F. Cartron, F.M. Vallette, S. Manon, and P. Juin. 2009. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 185:279-290.
- Gaudray, G., F. Gachon, J. Basbous, M. Biard-Piechaczyk, C. Devaux, and J.M. Mesnard. 2002. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* 76:12813-12822.
- Gavathiotis, E., M. Suzuki, M.L. Davis, K. Pitter, G.H. Bird, S.G. Katz, H.C. Tu, H. Kim, E.H. Cheng, N. Tjandra, and L.D. Walensky. 2008. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455:1076-1081.
- Gessain, A. 2004. Rétrovirus humains HTLV1 et HTLV2. *Encycl Med Chir., Maladies infectieuses*, 8-050-D-10, 12 p.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, K.S. Jones, C. Pique, and O. Hermine. 2010. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7:99.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J.M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P.M. van Endert, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80:6844-6854.
- Grassmann, R., S. Berchtold, I. Radant, M. Alt, B. Fleckenstein, J.G. Sodroski, W.A. Haseltine, and U. Ramstedt. 1992. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J Virol* 66:4570-4575.
- Grassmann, R., C. Dengler, I. Muller-Fleckenstein, B. Fleckenstein, K. McGuire, M.C. Dokhelar, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1989. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3351-3355.
- Grillot, D.A., R. Merino, J.C. Pena, W.C. Fanslow, F.D. Finkelman, C.B. Thompson, and G. Nunez. 1996. bcl-x exhibits regulated expression during B cell development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 183:381-391.
- Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.
- Grossman, W.J., J.T. Kimata, F.H. Wong, M. Zutter, T.J. Ley, and L. Ratner. 1995. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1057-1061.
- Grumont, R.J., I.J. Rourke, and S. Gerondakis. 1999. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:400-411.

- Hagiya, K., J. Yasunaga, Y. Satou, K. Ohshima, and M. Matsuoka. 2011. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 8:19.
- Hall, W.W., and M. Fujii. 2005. Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24:5965-5975.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hanon, E., S. Hall, G.P. Taylor, M. Saito, R. Davis, Y. Tanaka, K. Usuku, M. Osame, J.N. Weber, and C.R. Bangham. 2000a. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95:1386-1392.
- Hanon, E., J.C. Stinchcombe, M. Saito, B.E. Asquith, G.P. Taylor, Y. Tanaka, J.N. Weber, G.M. Griffiths, and C.R. Bangham. 2000b. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* 13:657-664.
- Hardwick, J.M., and D.S. Bellows. 2003. Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell death and differentiation* 10 Suppl 1:S68-76.
- Harhaj, E.W., L. Good, G. Xiao, and S.C. Sun. 1999. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* 18:1341-1349.
- Harhaj, E.W., L. Good, G. Xiao, M. Uhlik, M.E. Cvijic, I. Rivera-Walsh, and S.C. Sun. 2000. Somatic mutagenesis studies of NF-kappa B signaling in human T cells: evidence for an essential role of IKK gamma in NF-kappa B activation by T-cell costimulatory signals and HTLV-I Tax protein. *Oncogene* 19:1448-1456.
- Harhaj, E.W., and S.C. Sun. 1999. IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem* 274:22911-22914.
- Hartmann, E.M., and A. Rosenwald. 2010. Gene expression signatures of adult T-cell leukemia: is treatment response prediction on the horizon? *Leuk Lymphoma* 51:1157-1158.
- Hasegawa, H., H. Sawa, M.J. Lewis, Y. Orba, N. Sheehy, Y. Yamamoto, T. Ichinohe, Y. Tsunetsugu-Yokota, H. Katano, H. Takahashi, J. Matsuda, T. Sata, T. Kurata, K. Nagashima, and W.W. Hall. 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 12:466-472.
- Hasegawa, H., Y. Yamada, K. Tsukasaki, N. Mori, K. Tsuruda, D. Sasaki, T. Usui, A. Osaka, S. Atogami, C. Ishikawa, Y. Machijima, S. Sawada, T. Hayashi, Y. Miyazaki, and S. Kamihira. 2011. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. *Leukemia* 25:575-587.
- Herman, M.D., T. Nyman, M. Welin, L. Lehtio, S. Flodin, L. Tresaugues, T. Kotenyova, A. Flores, and P. Nordlund. 2008. Completing the family portrait of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: crystal structure of human Bfl-1 in complex with Bim. *FEBS Lett* 582:3590-3594.
- Higuchi, M., T. Matsuda, N. Mori, Y. Yamada, R. Horie, T. Watanabe, M. Takahashi, M. Oie, and M. Fujii. 2005. Elevated expression of CD30 in adult T-cell leukemia cell lines: possible role in constitutive NF-kappaB activation. *Retrovirology* 2:29.
- Hijikata, M., N. Kato, T. Sato, Y. Kagami, and K. Shimotohno. 1990. Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line. *J Virol* 64:4632-4639.
- Hinds, M.G., M. Lackmann, G.L. Skea, P.J. Harrison, D.C. Huang, and C.L. Day. 2003. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *The EMBO journal* 22:1497-1507.
- Hinds, M.G., C. Smits, R. Fredericks-Short, J.M. Risk, M. Bailey, D.C. Huang, and C.L. Day. 2007. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell death and differentiation* 14:128-136.
- Hironaka, N., K. Mochida, N. Mori, M. Maeda, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2004. Tax-independent constitutive IkappaB kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia* 6:266-278.

- Hivin, P., J. Basbous, F. Raymond, D. Henaff, C. Arpin-Andre, V. Robert-Hebmann, B. Barbeau, and J.M. Mesnard. 2007. The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology* 4:14.
- Hlela, C., S. Shepperd, N.P. Khumalo, and G.P. Taylor. 2009. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *AIDS reviews* 11:205-214.
- Huang, D.C., M. Hahne, M. Schroeter, K. Frei, A. Fontana, A. Villunger, K. Newton, J. Tschopp, and A. Strasser. 1999. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14871-14876.
- Ikezoe, T., Y. Yang, K. Bandobashi, T. Saito, S. Takemoto, H. Machida, K. Togitani, H.P. Koeffler, and H. Taguchi. 2005. Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways. *Mol Cancer Ther* 4:578-586.
- Ishikawa, C., S. Nakachi, M. Senba, M. Sugai, and N. Mori. 2010. Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis*
- Ishikawa, C., S. Nakachi, M. Senba, M. Sugai, and N. Mori. 2011. Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* 32:110-119.
- Isono, O., T. Ohshima, Y. Saeki, J. Matsumoto, M. Hijikata, K. Tanaka, and K. Shimotohno. 2008. Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J Biol Chem* 283:34273-34282.
- Iwai, K., N. Mori, M. Oie, N. Yamamoto, and M. Fujii. 2001. Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* 279:38-46.
- Jeong, S.J., H. Lu, W.K. Cho, H.U. Park, C. Pise-Masison, and J.N. Brady. 2006. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax. *J Virol* 80:10036-10044.
- Jeong, S.Y., B. Gaume, Y.J. Lee, Y.T. Hsu, S.W. Ryu, S.H. Yoon, and R.J. Youle. 2004. Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *The EMBO journal* 23:2146-2155.
- Ji, L., Y. Chen, T. Liu, and Z. Wang. 2008. Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 231:393-400.
- Jin, Z., D. Nagakubo, A.K. Shirakawa, T. Nakayama, A. Shigeta, K. Hieshima, Y. Yamada, and O. Yoshie. 2009. CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int J Cancer* 125:2229-2235.
- Jones, K.S., S. Lambert, M. Bouttier, L. Benit, F.W. Ruscetti, O. Hermine, and C. Pique. 2011. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 3:794-810.
- Jones, K.S., C. Petrow-Sadowski, D.C. Bertolette, Y. Huang, and F.W. Ruscetti. 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* 79:12692-12702.
- Jones, K.S., C. Petrow-Sadowski, Y.K. Huang, D.C. Bertolette, and F.W. Ruscetti. 2008. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14:429-436.
- Jourdan, M., T. Reme, H. Goldschmidt, G. Fiol, V. Pantesco, J. De Vos, J.F. Rossi, D. Hose, and B. Klein. 2009. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *British journal of haematology* 145:45-58.
- Journo, C., J. Filipe, F. About, S.A. Chevalier, P.V. Afonso, J.N. Brady, D. Flynn, F. Tangy, A. Israel, P.O. Vidalain, R. Mahieux, and R. Weil. 2009. NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to

- potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS pathogens* 5:e1000521.
- Kang, M.H., and C.P. Reynolds. 2009. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15:1126-1132.
- Kannagi, M., A. Hasegawa, S. Kinpara, Y. Shimizu, A. Takamori, and A. Utsunomiya. 2011. Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 by innate and acquired immunity. *Cancer Sci* 102:670-676.
- Karsan, A., E. Yee, and J.M. Harlan. 1996a. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J Biol Chem* 271:27201-27204.
- Karsan, A., E. Yee, K. Kaushansky, and J.M. Harlan. 1996b. Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* 87:3089-3096.
- Kater, A.P., L.M. Evers, E.B. Remmerswaal, A. Jaspers, M.F. Oosterwijk, R.A. van Lier, M.H. van Oers, and E. Eldering. 2004. CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *British journal of haematology* 127:404-415.
- Kawakami, A., T. Nakashima, H. Sakai, S. Urayama, S. Yamasaki, A. Hida, M. Tsuboi, H. Nakamura, H. Ida, K. Migita, Y. Kawabe, and K. Eguchi. 1999. Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* 94:3847-3854.
- Kelly, P.N., and A. Strasser. 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell death and differentiation* 18:1414-1424.
- Kerppola, T.K. 2006. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 1:1278-1286.
- Kerppola, T.K. 2008. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods in cell biology* 85:431-470.
- Kfoury, Y., R. Nasr, A. Favre-Bonvin, M. El-Sabban, N. Renault, M.L. Giron, N. Setterblad, H.E. Hajj, E. Chiari, A.G. Mikati, O. Hermine, A. Saib, H. de The, C. Pique, and A. Bazarbachi. 2008. Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27:1665-1676.
- Kfoury, Y., R. Nasr, O. Hermine, H. de The, and A. Bazarbachi. 2005. Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-kappaB pathway. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 1:871-877.
- Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y.N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z.M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin, and D. Kufe. 2000. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275:322-327.
- Kim, H., Y.N. Kim, and C.W. Kim. 2005. Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene* 24:1252-1261.
- Kim, J.K., K.D. Kim, E. Lee, J.S. Lim, H.J. Cho, H.K. Yoon, M.Y. Cho, K.E. Baek, Y.P. Park, S.G. Paik, Y.K. Choe, and H.G. Lee. 2004. Up-regulation of Bfl-1/A1 via NF-kappaB activation in cisplatin-resistant human bladder cancer cell line. *Cancer letters* 212:61-70.
- Kim, M.H., A.Z. Minton, and V. Agrawal. 2009. C/EBPbeta regulates metastatic gene expression and confers TNF-alpha resistance to prostate cancer cells. *The Prostate* 69:1435-1447.
- Kim, Y.M., T.R. Geiger, D.I. Egan, N. Sharma, and J.K. Nyborg. 2010. The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 29:2142-2152.
- Kim, Y.M., J.A. Ramirez, J.E. Mick, H.A. Giebler, J.P. Yan, and J.K. Nyborg. 2007. Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem* 282:18750-18757.
- Kirkin, V., S. Joos, and M. Zornig. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1644:229-249.
- Kitada, S., M. Leone, S. Sareth, D. Zhai, J.C. Reed, and M. Pellecchia. 2003. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols

- targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *Journal of medicinal chemistry* 46:4259-4264.
- Ko, J.K., K.H. Choi, Z. Pan, P. Lin, N. Weisleder, C.W. Kim, and J. Ma. 2007. The tail-anchoring domain of Bfl1 and HCCS1 targets mitochondrial membrane permeability to induce apoptosis. *J Cell Sci* 120:2912-2923.
- Ko, J.K., M.J. Lee, S.H. Cho, J.A. Cho, B.Y. Lee, J.S. Koh, S.S. Lee, Y.H. Shim, and C.W. Kim. 2003. Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene* 22:2457-2465.
- Konopleva, M., J. Watt, R. Contractor, T. Tsao, D. Harris, Z. Estrov, W. Bornmann, H. Kantarjian, J. Viallet, I. Samudio, and M. Andreeff. 2008. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res* 68:3413-3420.
- Koyanagi, Y., Y. Itoyama, N. Nakamura, K. Takamatsu, J. Kira, T. Iwamasa, I. Goto, and N. Yamamoto. 1993. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196:25-33.
- Krueger, A., S.C. Fas, M. Giaisi, M. Bleumink, A. Merling, C. Stumpf, S. Baumann, D. Holtkotte, V. Bosch, P.H. Krammer, and M. Li-Weber. 2006. HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* 107:3933-3939.
- Kucharczak, J.F., M.J. Simmons, C.S. Duckett, and C. Gelinas. 2005. Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell death and differentiation* 12:1225-1239.
- Kuhlmann, A.S., J. Villaudy, L. Gazzolo, M. Castellazzi, J.M. Mesnard, and M. Duc Dodon. 2007. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4:92.
- Kuroda, J., and M. Taniwaki. 2009. Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* 71:89-101.
- Kutuk, O., and A. Letai. 2008. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Curr Mol Med* 8:102-118.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J.E. Chipuk, C. Bonzon, B.A. Sullivan, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell* 17:525-535.
- Kuwana, T., M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342.
- Lairmore, M.D., L. Silverman, and L. Ratner. 2005. Animal models for human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection and transformation. *Oncogene* 24:6005-6015.
- Lambert, S., M. Bouttier, R. Vassy, M. Seigneuret, C. Petrow-Sadowski, S. Janvier, N. Heveker, F.W. Ruscetti, G. Perret, K.S. Jones, and C. Pique. 2009. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113:5176-5185.
- Lamsoul, I., J. Lodewick, S. Lebrun, R. Brasseur, A. Burny, R.B. Gaynor, and F. Bex. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 25:10391-10406.
- Landry, S., M. Halin, A. Vargas, I. Lemasson, J.M. Mesnard, and B. Barbeau. 2009. Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J Virol* 83:2048-2054.
- Leber, B., J. Lin, and D.W. Andrews. 2007. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12:897-911.
- Lee, E.F., P.E. Czabotar, B.J. Smith, K. Deshayes, K. Zobel, P.M. Colman, and W.D. Fairlie. 2007. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell death and differentiation* 14:1711-1713.

- Lee, H.H., H. Dadgostar, Q. Cheng, J. Shu, and G. Cheng. 1999. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9136-9141.
- Lemasson, I., M.R. Lewis, N. Polakowski, P. Hivin, M.H. Cavanagh, S. Thebault, B. Barbeau, J.K. Nyborg, and J.M. Mesnard. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J Virol* 81:1543-1553.
- Lemasson, I., N.J. Polakowski, P.J. Laybourn, and J.K. Nyborg. 2002. Transcription factor binding and histone modifications on the integrated proviral promoter in human T-cell leukemia virus-I-infected T-cells. *J Biol Chem* 277:49459-49465.
- Letai, A., M.C. Bassik, L.D. Walensky, M.D. Sorcinelli, S. Weiler, and S.J. Korsmeyer. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* 2:183-192.
- LeVasseur, R.J., S.O. Southern, and P.J. Southern. 1998. Mammary epithelial cells support and transfer productive human T-cell lymphotropic virus infections. *Journal of human virology* 1:214-223.
- Li, M., M. Kesic, H. Yin, L. Yu, and P.L. Green. 2009. Kinetic analysis of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression in cell culture and infected animals. *J Virol* 83:3788-3797.
- Lin, E.Y., A. Orlofsky, M.S. Berger, and M.B. Prystowsky. 1993. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 151:1979-1988.
- Liu, X., S. Dai, Y. Zhu, P. Marrack, and J.W. Kappler. 2003. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19:341-352.
- Liu, X., A. Nelson, X. Wang, N. Kanaji, M. Kim, T. Sato, M. Nakanishi, Y. Li, J. Sun, J. Michalski, A. Patil, H. Basma, and S.I. Rennard. 2009. MicroRNA-146a modulates human bronchial epithelial cell survival in response to the cytokine-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 380:177-182.
- Lodewick, J., I. Lamsoul, and F. Bex. 2011. Move or die: the fate of the Tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* 3:829-857.
- Lodewick, J., I. Lamsoul, A. Polania, S. Lebrun, A. Burny, L. Ratner, and F. Bex. 2009. Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* 386:68-78.
- Lopez-Ochoa, L., J. Ramirez-Prado, and L. Hanley-Bowdoin. 2006. Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells. *J Virol* 80:5841-5853.
- Loughran, S.T., E.M. Champion, B.N. D'Souza, S.M. Smith, K. Vrzalikova, K. Wen, P.G. Murray, and D. Walls. 2011. Bfl-1 is a crucial pro-survival nuclear factor-kappaB target gene in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Int J Cancer*
- Lovell, J.F., L.P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D.W. Andrews. 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135:1074-1084.
- Maguer-Satta, V., L. Gazzolo, and M.D. Dodon. 1995. Human immature thymocytes as target cells of the leukemogenic activity of human T-cell leukemia virus type I. *Blood* 86:1444-1452.
- Mahadevan, D., C. Spier, K. Della Croce, S. Miller, B. George, C. Riley, S. Warner, T.M. Grogan, and T.P. Miller. 2005. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. *Mol Cancer Ther* 4:1867-1879.
- Majorovits, E., M. Nejmeddine, Y. Tanaka, G.P. Taylor, S.D. Fuller, and C.R. Bangham. 2008. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* 3:e2251.
- Mandal, M., C. Borowski, T. Palomero, A.A. Ferrando, P. Oberdoerffer, F. Meng, A. Ruiz-Vela, M. Ciofani, J.C. Zuniga-Pflucker, I. Screpanti, A.T. Look, S.J. Korsmeyer, K. Rajewsky, H. von

- Boehmer, and I. Aifantis. 2005. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *The Journal of experimental medicine* 201:603-614.
- Manel, N., F.J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J.L. Battini. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115:449-459.
- Matsumoto, J., T. Ohshima, O. Isono, and K. Shimotohno. 2005. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* 24:1001-1010.
- Matsuoka, M. 2010. HTLV-1 bZIP factor gene: Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Mol Aspects Med* 31:359-366.
- Matsuoka, M., and P.L. Green. 2009. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 6:71.
- Matsuoka, M., and K.T. Jeang. 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7:270-280.
- Matsuoka, M., and K.T. Jeang. 2011. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* 30:1379-1389.
- Matteucci, C., E. Balestrieri, B. Macchi, and A. Mastino. 2004. Modulation of apoptosis during HTLV-1-mediated immortalization process in vitro. *Journal of medical virology* 74:473-483.
- Matutes, E. 2007. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Journal of clinical pathology* 60:1373-1377.
- Mazurov, D., A. Ilinskaya, G. Heidecker, P. Lloyd, and D. Derse. 2010. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS pathogens* 6:e1000788.
- Merino, D., M. Giam, P.D. Hughes, O.M. Siggs, K. Heger, L.A. O'Reilly, J.M. Adams, A. Strasser, E.F. Lee, W.D. Fairlie, and P. Bouillet. 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* 186:355-362.
- Michael, B., A.M. Nair, H. Hiraragi, L. Shen, G. Feuer, K. Boris-Lawrie, and M.D. Lairmore. 2004. Human T lymphotropic virus type-1 p30II alters cellular gene expression to selectively enhance signaling pathways that activate T lymphocytes. *Retrovirology* 1:39.
- Mihaylova, V.T., A.M. Green, M. Khurgel, O.J. Semmes, and G.M. Kupfer. 2008. Human T-cell leukemia virus I tax protein sensitizes p53-mutant cells to DNA damage. *Cancer Res* 68:4843-4852.
- Minn, A.J., C.M. Rudin, L.H. Boise, and C.B. Thompson. 1995. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86:1903-1910.
- Miura, H., M. Maeda, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2005. Distinct IkappaB kinase regulation in adult T cell leukemia and HTLV-I-transformed cells. *Experimental cell research* 308:29-40.
- Miyazaki, M., J. Yasunaga, Y. Taniguchi, S. Tamiya, T. Nakahata, and M. Matsuoka. 2007. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 81:5714-5723.
- Mohammad, R.M., S. Wang, A. Aboukameel, B. Chen, X. Wu, J. Chen, and A. Al-Katib. 2005. Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X(L) [(-)-gossypol] against diffuse large cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 4:13-21.
- Monti, S., K.J. Savage, J.L. Kutok, F. Feuerhake, P. Kurtin, M. Mihm, B. Wu, L. Pasqualucci, D. Neuberg, R.C. Aguiar, P. Dal Cin, C. Ladd, G.S. Pinkus, G. Salles, N.L. Harris, R. Dalla-Favera, T.M. Habermann, J.C. Aster, T.R. Golub, and M.A. Shipp. 2005. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105:1851-1861.
- Morales, A.A., A. Olsson, F. Celsing, A. Osterborg, M. Jondal, and L.M. Osorio. 2005. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 113:730-737.
- Mori, N., M. Fujii, G. Cheng, S. Ikeda, Y. Yamasaki, Y. Yamada, M. Tomonaga, and N. Yamamoto. 2001. Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus genes* 22:279-287.

- Mori, N., M. Fujii, S. Ikeda, Y. Yamada, M. Tomonaga, D.W. Ballard, and N. Yamamoto. 1999. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93:2360-2368.
- Mori, N., M. Fujii, K. Iwai, S. Ikeda, Y. Yamasaki, T. Hata, Y. Yamada, Y. Tanaka, M. Tomonaga, and N. Yamamoto. 2000. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95:3915-3921.
- Mori, N., Y. Yamada, S. Ikeda, Y. Yamasaki, K. Tsukasaki, Y. Tanaka, M. Tomonaga, N. Yamamoto, and M. Fujii. 2002. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 100:1828-1834.
- Mukhopadhyay, K., A. Kohli, and R. Prasad. 2002. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3695-3705.
- Murata, K., T. Hayashibara, K. Sugahara, A. Uemura, T. Yamaguchi, H. Harasawa, H. Hasegawa, K. Tsuruda, T. Okazaki, T. Koji, T. Miyanishi, Y. Yamada, and S. Kamihira. 2006. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol* 80:2495-2505.
- Nagakubo, D., Z. Jin, K. Hieshima, T. Nakayama, A.K. Shirakawa, Y. Tanaka, H. Hasegawa, T. Hayashi, K. Tsukasaki, Y. Yamada, and O. Yoshie. 2007. Expression of CCR9 in HTLV-1+ T cells and ATL cells expressing Tax. *Int J Cancer* 120:1591-1597.
- Nakamura, N., M. Fujii, T. Tsukahara, M. Arai, T. Ohashi, H. Wakao, M. Kannagi, and N. Yamamoto. 1999. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of STAT1 and STAT5 genes in T-cells. *Oncogene* 18:2667-2675.
- Nakashima, K., A. Kawakami, A. Hida, S. Yamasaki, H. Nakamura, M. Kamachi, T. Miyashita, F. Tanaka, Y. Izumi, M. Tamai, H. Ida, M. Furuyama, T. Koji, T. Nakamura, K. Migita, T. Origuchi, and K. Eguchi. 2003. Protection of mitochondrial perturbation by human T-lymphotropic virus type 1 tax through induction of Bcl-xL expression. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 142:341-347.
- Nakayama, T., K. Hieshima, T. Arao, Z. Jin, D. Nagakubo, A.K. Shirakawa, Y. Yamada, M. Fujii, N. Oiso, A. Kawada, K. Nishio, and O. Yoshie. 2008. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene* 27:3221-3232.
- Nasr, R., E. Chiari, M. El-Sabban, R. Mahieux, Y. Kfoury, M. Abdulhay, V. Yazbeck, O. Hermine, H. de The, C. Pique, and A. Bazarbachi. 2006. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* 107:4021-4029.
- Nauenburg, S., W. Zwerschke, and P. Jansen-Durr. 2001. Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:592-594.
- Nejmeddine, M., A.L. Barnard, Y. Tanaka, G.P. Taylor, and C.R. Bangham. 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* 280:29653-29660.
- Nejmeddine, M., V.S. Negi, S. Mukherjee, Y. Tanaka, K. Orth, G.P. Taylor, and C.R. Bangham. 2009. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114:1016-1025.
- Ni Chonghaile, T., K.A. Sarosiek, T.T. Vo, J.A. Ryan, A. Tammareddi, G. Moore Vdel, J. Deng, K.C. Anderson, P. Richardson, Y.T. Tai, C.S. Mitsiades, U.A. Matulonis, R. Drapkin, R. Stone, D.J. Deangelo, D.J. McConkey, S.E. Sallan, L. Silverman, M.S. Hirsch, D.R. Carrasco, and A. Letai. 2011. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* 334:1129-1133.
- Nicot, C., R. Mahieux, S. Takemoto, and G. Franchini. 2000. Bcl-X(L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. *Blood* 96:275-281.
- Nieborowska-Skorska, M., G. Hoser, P. Kossev, M.A. Wasik, and T. Skorski. 2002. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 99:4531-4539.

- Nishikori, M. 2005. Classical and Alternative NF- κ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 45(1), 15-24.
- Nyborg, J.K., D. Egan, and N. Sharma. 2010. The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochimica et biophysica acta* 1799:266-274.
- O'Mahony, A.M., M. Montano, K. Van Beneden, L.F. Chen, and W.C. Greene. 2004. Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically Active NF-kappaB requires IkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65. *J Biol Chem* 279:18137-18145.
- Ohshima, T., R. Mukai, N. Nakahara, J. Matsumoto, O. Isono, Y. Kobayashi, S. Takahashi, and K. Shimotohno. 2010. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *Journal of cellular biochemistry* 111:187-194.
- Okamoto, K., J. Fujisawa, M. Reth, and S. Yonehara. 2006. Human T-cell leukemia virus type-I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF-kappaB. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 11:177-191.
- Okazaki, S., R. Moriuchi, N. Yosizuka, K. Sugahara, T. Maeda, I. Jinnai, M. Tomonaga, S. Kamihira, and S. Katamine. 2001. HTLV-1 proviruses encoding non-functional TAX in adult T-cell leukemia. *Virus genes* 23:123-135.
- Olsson, A., M. Norberg, A. Okvist, K. Derkow, A. Choudhury, G. Tobin, F. Celsing, A. Osterborg, R. Rosenquist, M. Jondal, and L.M. Osorio. 2007. Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 97:769-777.
- Oltersdorf, T., S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, and S.H. Rosenberg. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677-681.
- Pagliari, L.J., H. Perlman, H. Liu, and R.M. Pope. 2000. Macrophages require constitutive NF-kappaB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol* 20:8855-8865.
- Pais-Correia, A.M., M. Sachse, S. Guadagnini, V. Robbiati, R. Lasserre, A. Gessain, O. Gout, A. Alcover, and M.I. Thoulouze. 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16:83-89.
- Pandit, B., and A.L. Gartel. 2010. New potential anti-cancer agents synergize with bortezomib and ABT-737 against prostate cancer. *The Prostate* 70:825-833.
- Pegman, P.M., S.M. Smith, B.N. D'Souza, S.T. Loughran, S. Maier, B. Kempkes, P.A. Cahill, M.J. Simmons, C. Gelinas, and D. Walls. 2006. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 trans-activates the cellular antiapoptotic bfl-1 gene by a CBF1/RBPJ kappa-dependent pathway. *J Virol* 80:8133-8144.
- Peloponese, J.M., Jr., H. Iha, V.R. Yedavalli, A. Miyazato, Y. Li, K. Haller, M. Benkirane, and K.T. Jeang. 2004. Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* 78:11686-11695.
- Peloponese, J.M., Jr., and K.T. Jeang. 2006. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J Biol Chem* 281:8927-8938.
- Peloponese, J.M., M.L. Yeung, and K.T. Jeang. 2006. Modulation of nuclear factor-kappaB by human T cell leukemia virus type 1 Tax protein: implications for oncogenesis and inflammation. *Immunologic research* 34:1-12.
- Pichler, K., G. Schneider, and R. Grassmann. 2008. MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 5:100.

- Pinon, J.D., P.J. Klasse, S.R. Jassal, S. Welson, J. Weber, D.W. Brighty, and Q.J. Sattentau. 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* 77:9922-9930.
- Pise-Masison, C.A., M. Radonovich, R. Mahieux, P. Chatterjee, C. Whiteford, J. Duvall, C. Guillermin, A. Gessain, and J.N. Brady. 2002. Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res* 62:3562-3571.
- Plati, J., O. Bucur, and R. Khosravi-Far. 2011. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3:279-296.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.D. Minna, and R.C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7415-7419.
- Portis, T., J.C. Harding, and L. Ratner. 2001. The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. *Blood* 98:1200-1208.
- Portis, T., and R. Longnecker. 2004. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 23:8619-8628.
- Proietti, F.A., A.B. Carneiro-Proietti, B.C. Catalan-Soares, and E.L. Murphy. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068.
- Pumfery, A., C. de la Fuente, and F. Kashanchi. 2006. HTLV-1 Tax: centrosome amplification and cancer. *Retrovirology* 3:50.
- Reed, J.C. 2011. Cancer. Priming cancer cells for death. *Science* 334:1075-1076.
- Reed, J.C., and M. Pellecchia. 2005. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106:408-418.
- Reinke, A.W., G. Grigoryan, and A.E. Keating. 2010. Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays. *Biochemistry* 49:1985-1997.
- Rende, F., I. Cavallari, A. Corradin, M. Silic-Benussi, F. Toulza, G.M. Toffolo, Y. Tanaka, S. Jacobson, G.P. Taylor, D.M. D'Agostino, C.R. Bangham, and V. Ciminale. 2011. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* 117:4855-4859.
- Ri, M., S. Iida, T. Ishida, A. Ito, H. Yano, A. Inagaki, J. Ding, S. Kusumoto, H. Komatsu, A. Utsunomiya, and R. Ueda. 2009. Bortezomib-induced apoptosis in mature T-cell lymphoma cells partially depends on upregulation of Noxa and functional repression of Mcl-1. *Cancer Sci* 100:341-348.
- Richardson, J.H., A.J. Edwards, J.K. Cruickshank, P. Rudge, and A.G. Dalgleish. 1990. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 64:5682-5687.
- Rousset, R., C. Desbois, F. Bantignies, and P. Jalinot. 1996. Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* 381:328-331.
- Ruckes, T., D. Saul, J. Van Snick, O. Hermine, and R. Grassmann. 2001. Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood* 98:1150-1159.
- Ruggero, K., A. Corradin, P. Zanollo, A. Amadori, V. Bronte, V. Ciminale, and D.M. D'Agostino. 2010. Role of microRNAs in HTLV-1 infection and transformation. *Mol Aspects Med* 31:367-382.
- Saccucci, L., J.M. Crance, P. Colas, M. Bickle, D. Garin, and F. Iseni. 2009. Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers. *Antiviral research* 82:134-140.
- Saggioro, D., L. Acquasaliente, L. Daprai, and L. Chieco-Bianchi. 2003. Inhibition of apoptosis by human T-lymphotropic virus type-1 tax protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010:591-597.
- Saito, M., T. Matsuzaki, Y. Satou, J. Yasunaga, K. Saito, K. Arimura, M. Matsuoka, and Y. Ohara. 2009. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6:19.

- Salameh, A., F. Galvagni, F. Anselmi, C. De Clemente, M. Orlandini, and S. Oliviero. 2010. Growth factor stimulation induces cell survival by c-Jun. ATF2-dependent activation of Bcl-XL. *J Biol Chem* 285:23096-23104.
- Salerni, B.L., D.J. Bates, T.C. Albershardt, C.H. Lowrey, and A. Eastman. 2010. Vinblastine induces acute, cell cycle phase-independent apoptosis in some leukemias and lymphomas and can induce acute apoptosis in others when Mcl-1 is suppressed. *Mol Cancer Ther* 9:791-802.
- Sanda, T., K. Asamitsu, H. Ogura, S. Iida, A. Utsunomiya, R. Ueda, and T. Okamoto. 2006. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 20:590-598.
- Sarkar, S.A., B. Kutlu, K. Velmurugan, S. Kizaka-Kondoh, C.E. Lee, R. Wong, A. Valentine, H.W. Davidson, J.C. Hutton, and S. Pugazhenth. 2009. Cytokine-mediated induction of anti-apoptotic genes that are linked to nuclear factor kappa-B (NF-kappaB) signalling in human islets and in a mouse beta cell line. *Diabetologia* 52:1092-1101.
- Satou, Y., and M. Matsuoka. 2010. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 50:1-8.
- Satou, Y., K. Nosaka, Y. Koya, J.I. Yasunaga, S. Toyokuni, and M. Matsuoka. 2004. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* 18:1357-1363.
- Satou, Y., J. Yasunaga, M. Yoshida, and M. Matsuoka. 2006. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:720-725.
- Satou, Y., J. Yasunaga, T. Zhao, M. Yoshida, P. Miyazato, K. Takai, K. Shimizu, K. Ohshima, P.L. Green, N. Ohkura, T. Yamaguchi, M. Ono, S. Sakaguchi, and M. Matsuoka. 2011. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS pathogens* 7:e1001274.
- Schafer, B., J. Quispe, V. Choudhary, J.E. Chipuk, T.G. Ajero, H. Du, R. Schneider, and T. Kuwana. 2009. Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Molecular biology of the cell* 20:2276-2285.
- Schmitt, E., M. Beauchemin, and R. Bertrand. 2007. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene* 26:5851-5865.
- Setoyama, M., F.A. Kerdel, G. Elgart, T. Kanzaki, and J.J. Byrnes. 1998. Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. *The American journal of pathology* 152:683-689.
- Shaulian, E. 2010. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22:894-899.
- Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* 4:E131-136.
- Shembade, N., and E.W. Harhaj. 2010. Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF-kappaB activation. *World journal of biological chemistry* 1:13-20.
- Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487.
- Shimizu, S., Y. Shinohara, and Y. Tsujimoto. 2000. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:4309-4318.
- Shimizu, S., T. Takehara, H. Hikita, T. Kodama, T. Miyagi, A. Hosui, T. Tatsumi, H. Ishida, T. Noda, H. Nagano, Y. Doki, M. Mori, and N. Hayashi. 2010. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 52:698-704.
- Silbermann, K., and R. Grassmann. 2007. Human T cell leukemia virus type 1 tax-induced signals in cell survival, proliferation, and transformation. *Signal transduction* 7:34-52.
- Silic-Benussi, M., R. Biasiotto, V. Andresen, G. Franchini, D.M. D'Agostino, and V. Ciminale. 2010. HTLV-1 p13, a small protein with a busy agenda. *Mol Aspects Med* 31:350-358.

- Simmons, M.J., G. Fan, W.X. Zong, K. Degenhardt, E. White, and C. Gelinas. 2008. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27:1421-1428.
- Simonian, P.L., D.A. Grillo, and G. Nunez. 1997. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 90:1208-1216.
- Sinha-Datta, U., J.M. Taylor, M. Brown, and C. Nicot. 2008. Celecoxib disrupts the canonical apoptotic network in HTLV-I cells through activation of Bax and inhibition of PKB/Akt. *Apoptosis* 13:33-40.
- Socolovsky, M., A.E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara, and H.F. Lodish. 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98:181-191.
- Sonoda, S., H.C. Li, and K. Tajima. 2011. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. *Cancer Sci* 102:295-301.
- Soriano, M.E., and L. Scorrano. 2011. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell* 145:15-17.
- Stein, B., A.S. Baldwin, Jr., D.W. Ballard, W.C. Greene, P. Angel, and P. Herrlich. 1993. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *The EMBO journal* 12:3879-3891.
- Strasser, A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 5:189-200.
- Strasser, A., A.W. Harris, D.C. Huang, P.H. Krammer, and S. Cory. 1995. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *The EMBO journal* 14:6136-6147.
- Suemori, K., H. Fujiwara, T. Ochi, T. Ogawa, M. Matsuoka, T. Matsumoto, J.M. Mesnard, and M. Yasukawa. 2009. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of general virology* 90:1806-1811.
- Sun, S.C., and D.W. Ballard. 1999. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene* 18:6948-6958.
- Sun, S.C., and S. Yamaoka. 2005. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* 24:5952-5964.
- Swaims, A.Y., F. Khani, Y. Zhang, A.I. Roberts, S. Devadas, Y. Shi, and A.B. Rabson. 2010. Immune activation induces immortalization of HTLV-1 LTR-Tax transgenic CD4+ T cells. *Blood* 116:2994-3003.
- Tahir, S.K., J. Wass, M.K. Joseph, V. Devanarayan, P. Hessler, H. Zhang, S.W. Elmore, P.E. Kroeger, C. Tse, S.H. Rosenberg, and M.G. Anderson. 2010. Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 9:545-557.
- Takeda, S., M. Maeda, S. Morikawa, Y. Taniguchi, J. Yasunaga, K. Nosaka, Y. Tanaka, and M. Matsuoka. 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 109:559-567.
- Tamiya, S., M. Matsuoka, K. Etoh, T. Watanabe, S. Kamihira, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki. 1996. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88:3065-3073.
- Tanaka, A., C. Takahashi, S. Yamaoka, T. Nosaka, M. Maki, and M. Hatanaka. 1990. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1071-1075.
- Taylor, J.M., S. Ghorbel, and C. Nicot. 2009. Genome wide analysis of human genes transcriptionally and post-transcriptionally regulated by the HTLV-I protein p30. *BMC genomics* 10:311.
- Taylor, J.M., and C. Nicot. 2008. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 13:733-747.
- Terme, J.M., V. Mocquet, A.S. Kuhlmann, L. Zane, F. Mortreux, E. Wattel, M. Duc Dodon, and P. Jalinot. 2009. Inhibition of the hTERT promoter by the proto-oncogenic protein TAL1. *Leukemia* 23:2081-2089.

- Thebault, S., J. Basbous, P. Hivin, C. Devaux, and J.M. Mesnard. 2004. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 562:165-170.
- Thomas, L.W., C. Lam, and S.W. Edwards. 2010. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584:2981-2989.
- Timar, J., B. Gyorffy, and E. Raso. 2010. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clinical & experimental metastasis* 27:371-387.
- Tomita, M., Y. Tanaka, and N. Mori. 2009. MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *Int J Cancer*
- Trescol-Biemont, M.C., C. Verschelde, A. Cottalorda, and N. Bonnefoy-Berard. 2004. Regulation of A1/Bfl-1 expression in peripheral splenic B cells. *Biochimie* 86:287-294.
- Trevisan, R., L. Daprai, L. Paloschi, N. Vajente, L. Chieco-Bianchi, and D. Saggioro. 2006. Antiapoptotic effect of human T-cell leukemia virus type 1 tax protein correlates with its creb transcriptional activity. *Experimental cell research* 312:1390-1400.
- Trudel, S., Z.H. Li, J. Rauw, R.E. Tiedemann, X.Y. Wen, and A.K. Stewart. 2007. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* 109:5430-5438.
- Tse, C., A.R. Shoemaker, J. Adickes, M.G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E.F. Johnson, K.C. Marsh, M.J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S.K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S.H. Rosenberg, and S.W. Elmore. 2008. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 68:3421-3428.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe, and C.M. Croce. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.
- Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099.
- Tsukahara, T., M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, and M. Fujii. 1999. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol* 73:7981-7987.
- Tsukasaki, K., O. Hermine, A. Bazarbachi, L. Ratner, J.C. Ramos, W. Harrington, Jr., D. O'Mahony, J.E. Janik, A.L. Bittencourt, G.P. Taylor, K. Yamaguchi, A. Utsunomiya, K. Tobinai, and T. Watanabe. 2009. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 27:453-459.
- Tsumuraya, T., C. Ishikawa, Y. Machijima, S. Nakachi, M. Senba, J. Tanaka, and N. Mori. 2011. Effects of hippuristanol, an inhibitor of eIF4A, on adult T-cell leukemia. *Biochemical pharmacology* 81:713-722.
- Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50:481-492.
- Uozumi, K. 2010. Treatment of adult T-cell leukemia. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 50:9-25.
- Upreti, M., E.N. Galitovskaya, R. Chu, A.J. Tackett, D.T. Terrano, S. Granell, and T.C. Chambers. 2008. Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J Biol Chem* 283:35517-35525.
- Usui, T., K. Yanagihara, K. Tsukasaki, K. Murata, H. Hasegawa, Y. Yamada, and S. Kamihira. 2008. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* 5:34.
- Vajente, N., R. Trevisan, and D. Saggioro. 2009. HTLV-1 Tax protein cooperates with Ras in protecting cells from apoptosis. *Apoptosis* 14:153-163.
- Vallabhapurapu, S., and M. Karin. 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27:693-733.
- van Delft, M.F., A.H. Wei, K.D. Mason, C.J. Vandenberg, L. Chen, P.E. Czabotar, S.N. Willis, C.L. Scott, C.L. Day, S. Cory, J.M. Adams, A.W. Roberts, and D.C. Huang. 2006. The BH3 mimetic ABT-737

- targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer cell* 10:389-399.
- Van Prooyen, N., V. Andresen, H. Gold, I. Bialuk, C. Pise-Masison, and G. Franchini. 2010. Hijacking the T-cell communication network by the human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) p12 and p8 proteins. *Mol Aspects Med* 31:333-343.
- Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442.
- Veis, D.J., C.L. Sentman, E.A. Bach, and S.J. Korsmeyer. 1993. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 151:2546-2554.
- Verdonck, K., E. Gonzalez, S. Van Dooren, A.M. Vandamme, G. Vanham, and E. Gotuzzo. 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet infectious diseases* 7:266-281.
- Verhaegen, M., J.A. Bauer, C. Martin de la Vega, G. Wang, K.G. Wolter, J.C. Brenner, Z. Nikolovska-Coleska, A. Bengtson, R. Nair, J.T. Elder, M. Van Brocklin, T.E. Carey, C.R. Bradford, S. Wang, and M.S. Soengas. 2006. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res* 66:11348-11359.
- Vershelde, C., D. Michonneau, M.C. Trescol-Biemont, I. Berberich, A. Schimpl, and N. Bonnefoy-Berard. 2006. Overexpression of the antiapoptotic protein A1 promotes the survival of double positive thymocytes awaiting positive selection. *Cell death and differentiation* 13:1213-1221.
- Vershelde, C., T. Walzer, P. Galia, M.C. Biemont, L. Quemeneur, J.P. Revillard, J. Marvel, and N. Bonnefoy-Berard. 2003. A1/Bfl-1 expression is restricted to TCR engagement in T lymphocytes. *Cell death and differentiation* 10:1059-1067.
- Villaudy, J., M. Wencker, N. Gadot, N.A. Gillet, J.Y. Scoazec, L. Gazzolo, M.G. Manz, C.R. Bangham, and M.D. Dodon. 2011. HTLV-1 Propels Thymic Human T Cell Development in "Human Immune System" Rag2 gamma c Mice. *PLoS pathogens* 7:e1002231.
- Vogler, M., M. Butterworth, A. Majid, R.J. Walewska, X.M. Sun, M.J. Dyer, and G.M. Cohen. 2009a. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113:4403-4413.
- Vogler, M., D. Dinsdale, M.J. Dyer, and G.M. Cohen. 2009b. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell death and differentiation* 16:360-367.
- Vogler, M., S.D. Furdas, M. Jung, T. Kuwana, M.J. Dyer, and G.M. Cohen. 2010. Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clin Cancer Res* 16:4217-4225.
- Vogler, M., K. Weber, D. Dinsdale, I. Schmitz, K. Schulze-Osthoff, M.J. Dyer, and G.M. Cohen. 2009c. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell death and differentiation* 16:1030-1039.
- Walensky, L.D., A.L. Kung, I. Escher, T.J. Malia, S. Barbuto, R.D. Wright, G. Wagner, G.L. Verdine, and S.J. Korsmeyer. 2004. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 305:1466-1470.
- Wang, C.Y., D.C. Guttridge, M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:5923-5929.
- Wang, M., D. Windgassen, and E.T. Papoutsakis. 2008. A global transcriptional view of apoptosis in human T-cell activation. *BMC medical genomics* 1:53.
- Watanabe, M., T. Ohsugi, M. Shoda, T. Ishida, S. Aizawa, M. Maruyama-Nagai, A. Utsunomiya, S. Koga, Y. Yamada, S. Kamihira, A. Okayama, H. Kikuchi, K. Uozumi, K. Yamaguchi, M. Higashihara, K. Umezawa, T. Watanabe, and R. Horie. 2005. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106:2462-2471.

- Watanabe, T., M. Seiki, and M. Yoshida. 1984. HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology* 133:238-241.
- Watters, K.M., J. Dean, H. Hasegawa, H. Sawa, W. Hall, and N. Sheehy. 2010. Cytokine and growth factor expression by HTLV-1 Lck-tax transgenic cells in SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26:593-603.
- Wei, J., S. Kitada, M.F. Rega, J.L. Stebbins, D. Zhai, J. Cellitti, H. Yuan, A. Emdadi, R. Dahl, Z. Zhang, L. Yang, J.C. Reed, and M. Pellecchia. 2009. Apogossypol derivatives as pan-active inhibitors of antiapoptotic B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) family proteins. *Journal of medicinal chemistry* 52:4511-4523.
- Wei, J., J.L. Stebbins, S. Kitada, R. Dash, W. Placzek, M.F. Rega, B. Wu, J. Cellitti, D. Zhai, L. Yang, R. Dahl, P.B. Fisher, J.C. Reed, and M. Pellecchia. 2010. BI-97C1, an optically pure Apogossypol derivative as pan-active inhibitor of antiapoptotic B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) family proteins. *Journal of medicinal chemistry* 53:4166-4176.
- Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- Wencker, M., C. Sausse, D. Derse, L. Gazzolo, and M. Duc Dodon. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein down-regulates pre-T-cell receptor alpha gene transcription in human immature thymocytes. *J Virol* 81:301-308.
- Wencker, M. 2009. Evaluation de l'activité pro-leucémogène de la protéine TaxHTLV-1 dans les thymocytes immatures humains, sous la direction de Madeleine Duc Dodon : *Université Claude Bernard - Lyon I*. Thèse doctorat : 025-2009.
- Wertz, I.E., and V.M. Dixit. 2010. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell death and differentiation* 17:14-24.
- Willimott, S., and S.D. Wagner. 2010. Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochemical Society transactions* 38:1571-1575.
- Willis, S.N., and J.M. Adams. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology* 17:617-625.
- Willis, S.N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J.I. Fletcher, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19:1294-1305.
- Willis, S.N., J.I. Fletcher, T. Kaufmann, M.F. van Delft, L. Chen, P.E. Czabotar, H. Ierino, E.F. Lee, W.D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R.M. Kluck, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-859.
- Xia, L., E. Wurmbach, S. Waxman, and Y. Jing. 2006. Upregulation of Bfl-1/A1 in leukemia cells undergoing differentiation by all-trans retinoic acid treatment attenuates chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Leukemia* 20:1009-1016.
- Xiao, G., M.E. Cvijic, A. Fong, E.W. Harhaj, M.T. Uhlik, M. Waterfield, and S.C. Sun. 2001. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *The EMBO journal* 20:6805-6815.
- Xu, C.W., and Z. Luo. 2002. Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers. *Oncogene* 21:5753-5757.
- Xu, C.W., A.R. Mendelsohn, and R. Brent. 1997. Cells that register logical relationships among proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12473-12478.
- Yan, P., J. Fu, Z. Qu, S. Li, T. Tanaka, M.J. Grusby, and G. Xiao. 2009. PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* 113:4370-4380.
- Yang, H., N. Magilnick, X. Ou, and S.C. Lu. 2005. Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1. *The Biochemical journal* 391:399-408.

- Yang, J., T. Ikezoe, C. Nishioka, M. Furihata, and A. Yokoyama. 2010. AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 9:3386-3395.
- Yang, Y.C., T.Y. Hsu, R.H. Lin, I.J. Su, J.Y. Chen, and C.S. Yang. 2002. Resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human T-lymphotropic virus type I-infected T cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:207-212.
- Yasunaga, J., and K.T. Jeang. 2009. Viral transformation and aneuploidy. *Environmental and molecular mutagenesis* 50:733-740.
- Yasunami, T., Y.H. Wang, K. Tsuji, M. Takanashi, Y. Yamada, and T. Motoji. 2007. Multidrug resistance protein expression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia research* 31:465-470.
- Yecies, D., N.E. Carlson, J. Deng, and A. Letai. 2010. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 115:3304-3313.
- Yeung, M.L., J. Yasunaga, Y. Bennasser, N. Dusetti, D. Harris, N. Ahmad, M. Matsuoka, and K.T. Jeang. 2008. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res* 68:8976-8985.
- Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2031-2035.
- Yoshida, M., Y. Satou, J. Yasunaga, J. Fujisawa, and M. Matsuoka. 2008. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol* 82:9359-9368.
- Youle, R.J., and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9:47-59.
- Yuan, J., and G. Kroemer. 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 24:2592-2602.
- Zall, H., A. Weber, R. Besch, N. Zantl, and G. Hacker. 2010. Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Molecular cancer* 9:164.
- Zane, L., D. Sibon, L. Jeannin, M. Zandecki, M.H. Delfau-Larue, A. Gessain, O. Gout, C. Pinatel, A. Lancon, F. Mortreux, and E. Wattel. 2010a. Tax gene expression and cell cycling but not cell death are selected during HTLV-1 infection in vivo. *Retrovirology* 7:17.
- Zane, L., D. Sibon, C. Legras, J. Lachuer, A. Wierinckx, P. Mehlen, M.H. Delfau-Larue, A. Gessain, O. Gout, C. Pinatel, A. Lancon, F. Mortreux, and E. Wattel. 2010b. Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8+ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* 407:341-351.
- Zhai, D., C. Jin, Z. Huang, A.C. Satterthwait, and J.C. Reed. 2008a. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem* 283:9580-9586.
- Zhai, D., C. Jin, A.C. Satterthwait, and J.C. Reed. 2006. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell death and differentiation* 13:1419-1421.
- Zhai, D., C. Jin, C.W. Shiau, S. Kitada, A.C. Satterthwait, and J.C. Reed. 2008b. Gambogic acid is an antagonist of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* 7:1639-1646.
- Zhang, H.Z., S. Kasibhatla, Y. Wang, J. Herich, J. Guastella, B. Tseng, J. Drewe, and S.X. Cai. 2004. Discovery, characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay. *Bioorganic & medicinal chemistry* 12:309-317.
- Zhang, J., O. Yamada, S. Kida, Y. Matsushita, S. Yamaoka, H. Chagan-Yasutan, and T. Hattori. 2011. Identification of CD44 as a downstream target of noncanonical NF-kappaB pathway activated by human T-cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein. *Virology* 413:244-252.
- Zhang, J., O. Yamada, Y. Matsushita, H. Chagan-Yasutan, and T. Hattori. 2010. Transactivation of human osteopontin promoter by human T-cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein. *Leukemia research* 34:763-768.
- Zhao, T., Y. Satou, K. Sugata, P. Miyazato, P.L. Green, T. Imamura, and M. Matsuoka. 2011. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood* 118:1865-1876.

- Zhao, T., J. Yasunaga, Y. Satou, M. Nakao, M. Takahashi, M. Fujii, and M. Matsuoka. 2009. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* 113:2755-2764.
- Zhi, H., L. Yang, Y.L. Kuo, Y.K. Ho, H.M. Shih, and C.Z. Giam. 2011. NF-kappaB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS pathogens* 7:e1002025.
- Zhou, H.J., L.V. Pham, A.T. Tamayo, Y.C. Lin-Lee, L. Fu, L.C. Yoshimura, and R.J. Ford. 2007. Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 110:2121-2127.
- Zimmerman, B., S. Niewiesk, and M.D. Lairmore. 2010. Mouse models of human T lymphotropic virus type-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Veterinary pathology* 47:677-689.
- Zong, W.X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:382-387.
- Zong, W.X., T. Lindsten, A.J. Ross, G.R. MacGregor, and C.B. Thompson. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481-1486.

Annexe

Annexe

Annexe : Bilan de la sélection des molécules retenues après caractérisation *in vitro*

Nom de la molécule	Spécificité de la voie mitochondriale ¹	Spécificité de Bfl-1 par rapport à Bcl-x _L ²	Capacité à rompre interaction ³ (pull down)	Capacité à rompre interaction ⁴ (FPA)	Toxicité PBMC sains au repos ⁵	Toxicité lignées lymphoïdes ⁶
IBF-1	Pas de mort des MEF-WT ni des MEF-DKO	Non étudié	Aucun effet	Aucun effet	Pas toxique jusqu'à 25 µM	Jusqu'à 40% de mort à 12,5 µM selon les lignées
IBF-18	Mort des MEF-WT mais pas des MEF-DKO	Plus de mort des cellules 3T3-Bfl-1 que des cellules 3T3-Bcl-x _L dès 6 µM	Aucun effet	Effet positif mais IC ₅₀ non mesurable	Non toxique jusqu'à 12,5 µM	Jusqu'à 40% de mort à 3 µM selon les lignées
IBF-80					25% de toxicité à 50 µM	Jusqu'à 50% de mort à 12,5 µM selon les lignées
IBF-81					Aucun effet	Non étudié
IBF-72	Pas de mort des MEF-WT ni des MEF-DKO	Plus de mort des cellules 3T3-Bfl-1 que des cellules 3T3-Bcl-x _L dès 25 µM	Aucun effet	Effet positif mais IC ₅₀ non mesurable	Non toxique jusqu'à 25 µM	Jusqu'à 60% de mort à 12,5 µM selon les lignées
IBF-74	Pas de mort des MEF-WT ni des MEF-DKO	Pas d'effet	Inhibe interaction Bfl-1/Bim, Bid ou Bax à 50 µM	Effet positif mais IC ₅₀ non mesurable	Non toxique jusqu'à 25 µM	Non étudié
IBF-75	Mort des MEF-WT et des MEF-DKO	Autant de mort pour les cellules 3T3-Bfl-1 que les cellules 3T3-Bcl-x _L à 6 µM	Aucun effet	Aucun effet	Non toxique jusqu'à 6 µM	Jusqu'à 50% de mort à 12,5 µM selon les lignées

¹ : Effet des molécules sur la mortalité des MEF-WT et des MEF-DKO Bax/Bak (déficiences pour Bax et Bak). Une molécule induisant la mort des MEF-WT mais pas des MEF-DKO induit la mort cellulaire via la voie mitochondriale impliquant les membres de la famille Bcl-2.

² : Les cellules 3T3 surexprimant Bfl-1 ou Bcl-x_L ont été cultivées en absence de sérum. Le traitement de ces cellules par les molécules permet d'inhiber les protéines Bfl-1 ou Bcl-x_L et de sensibiliser les cellules à la mort induite par la privation de sérum.

³ : Etude de la capacité des molécules à rompre les interactions Bfl-1/Bim, Bfl-1/Bid ou Bfl-1/Bax à 50 µM par pull down.

⁴ : Etude de la capacité des molécules à rompre l'interaction Bfl-1/Bid en polarisation de fluorescence (FPA) et mesure de l'IC₅₀ (concentration à laquelle une molécule induit la moitié de son effet maximal).

⁵ : Etude de la toxicité des molécules sur des PBMC saines au repos en dose-réponse à 48h.

⁶ : Etude de la toxicité des molécules sur des lignées lymphoblastoïdes B (IM9, BP3, BJAB et RS4.11) après 48h de traitement.

Pas toxicité = induit moins de 20% de mort cellulaire

Sur fond bleu = résultats permettant la sélection de la molécule.

Régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L par les protéines virales Tax et HBZ du virus HTLV-1 et identification de petites molécules anti-Bfl-1 à visée thérapeutique

Le virus humain T lymphotrope de type 1 (HTLV-1) est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL) qui se développe après plusieurs décennies et pour laquelle il n'existe à ce jour pas de traitement efficace. Parmi les protéines virales de HTLV-1, Tax et HBZ jouent un rôle déterminant dans le développement de l'ATLL. Si Tax participe au processus leucémogène dès les étapes précoces, HBZ jouerait plutôt un rôle dans le maintien du phénotype tumoral dans les étapes tardives. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L de la famille Bcl-2, par les protéines virales Tax et HBZ. Nous avons montré que Tax induit l'expression des protéines anti-apoptotiques Bfl-1 et Bcl-x_L via la voie NF-κB, alors que HBZ n'a aucun effet sur leur expression. De plus, Tax coopère avec les facteurs de transcription c-Jun et JunD de la voie AP-1 pour augmenter l'expression de ces gènes anti-apoptotiques. En revanche, HBZ module uniquement la *trans*-activation de *bfl-1* induite par Tax. L'ensemble de nos résultats indique donc que **Tax joue un rôle prépondérant dans l'activation de l'expression de Bfl-1 et de Bcl-x_L et suggère que Bfl-1 et Bcl-x_L sont exprimées au cours des étapes précoces et tardives du développement de l'ATLL**. Par une stratégie d'ARN interférence, nous avons ensuite montré que Bfl-1 et/ou Bcl-x_L sont impliquées dans la survie de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, **suggérant que Bfl-1 et Bcl-x_L représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter l'ATLL**. Actuellement, il existe des petites molécules ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, mais aucune ne cible spécifiquement Bfl-1. En collaboration avec la société IMAXIO, nous avons identifié par deux cribles haut débit 83 molécules capables d'inhiber l'activité anti-apoptotique de Bfl-1. L'une de ces molécules induit spécifiquement la mort de lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 pour lesquelles Bfl-1 représente un gène de survie. Ainsi, **ce travail doit permettre à terme de développer de futurs médicaments dirigés contre Bfl-1 et de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique ciblée contre l'ATLL**.

Regulation of Bfl-1 and Bcl-x_L anti-apoptotic protein expression by the HTLV-1 Tax and HBZ proteins and identification of small therapeutic molecules directed against Bfl-1

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) that develops after several decades and for which there is no effective treatment. Among the viral proteins of HTLV-1, Tax and HBZ play a major role in the development of ATLL. If Tax participates in the initiation of leukemogenesis from the early stages, HBZ rather plays a role in maintaining the tumor phenotype in the late stages. The aims of our study were to better understand the regulation of Bfl-1 and Bcl-x_L anti-apoptotic protein expression by Tax and HBZ viral proteins, as well as their role in the survival of HTLV-1-infected T-cells to propose new therapeutic strategies. We showed that Tax induces Bfl-1 and Bcl-x_L expression via the NF-κB pathway, whereas HBZ has no effect on their expression. Tax also cooperates with c-Jun and JunD transcription factors of AP-1 family to increase the expression of these anti-apoptotic genes. By contrast, HBZ modulates the Tax-induced *bfl-1* *trans*-activation. Altogether, our data indicate that **Tax plays a key role in activating Bfl-1 and Bcl-x_L expression and suggests that Bfl-1 and Bcl-x_L are potentially expressed during the early and the late stages of ATLL development**. Using short hairpin RNA strategy, we then showed that Bfl-1 and/or Bcl-x_L are involved in HTLV-1-infected T-cell line survival, indicating that **Bfl-1 and Bcl-x_L represent potential therapeutic targets in the case of ATLL**. One approach currently being developed in anti-cancer drug discovery is to search for small inhibitory compounds targeting anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. But so far, no drug specifically targeting Bfl-1 is available. In collaboration with the IMAXIO Company, we have identified 83 molecules able to inhibit Bfl-1 anti-apoptotic activity using two high-throughput screenings. One of these molecules specifically induced the death of HTLV-1-infected T-cell for which Bfl-1 represents a survival gene. **This work provides new insight for long-term development of future drugs directed against Bfl-1 and should allow us to propose new therapeutic strategy for ATLL treatment.**

DISCIPLINE : Virologie - Cancérologie

MOTS-CLES : HTLV-1, ATLL, Tax, HBZ, Bfl-1, Bcl-x_L, NF-κB, AP-1, apoptose, cible thérapeutique

Laboratoire d'Immunité, d'Infection et de Vaccination - Inserm U851

21 avenue Tony Garnier

69365 Lyon Cedex 07