



**HAL**  
open science

# Dérégulation de l'épissage alternatif lors de l'infection par le virus HTLV-1 : rôle de Tax

Morgan Thénoz

► **To cite this version:**

Morgan Thénoz. Dérégulation de l'épissage alternatif lors de l'infection par le virus HTLV-1 : rôle de Tax. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10059 . tel-00995617

**HAL Id: tel-00995617**

**<https://theses.hal.science/tel-00995617>**

Submitted on 23 May 2014

**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 EDISS

Ecole doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé ED N°205

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le Jeudi 10 Avril 2014

par

**Morgan Thénoz**

**Dérégulation de l'épissage alternatif lors de l'infection  
par HTLV-1 : rôle de Tax**

Directeur de thèse :  
Docteur Franck Mortreux

JURY : Pr. Jérôme Lamartine (Président)  
Dr. Claudine Pique (Rapporteur)  
Dr. Eric Batsché (Rapporteur)  
Dr. Stephan Vagner (Rapporteur)  
Dr. Franck Mortreux (Directeur de thèse)

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement le professeur Laurent Schaeffer pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que le Professeur Eric Wattel pour m'avoir accueilli au sein de son équipe Oncovirologie et Biothérapies et permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Je témoigne toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Franck Mortreux, directeur de ma thèse, pour l'encadrement technique et scientifique de ce travail, pour son soutien lors des moments difficiles, ainsi que pour son aide précieuse apportée au cours de la rédaction de ce mémoire.

J'aimerais remercier le professeur Lamartine ainsi que les docteurs Pique, Batsché et Vagner, d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je souhaiterais remercier tous les membres du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule qui ont contribué à la réussite de ma thèse, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je voudrais remercier mes parents, ma famille, mes amis, mes collègues. Qu'ils sachent que je ne les oublie pas.

## PREMBULE

Mon travail au sein de l'équipe Oncovirologie et Biothérapie m'a amené à m'intéresser aux mécanismes de régulation de l'expression des gènes cellulaires lors de l'infection par le virus T lymphotrope humain (HTLV-1), responsable de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL) et de nombreuses maladies inflammatoires.

J'ai participé à l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *hTERT* par l'oncoprotéine Tax du HTLV-1, identifiant le proto-oncogène Dek comme nouveau partenaire cellulaire de Tax (*Karam M, Thénnoz M & al., sous presse. 2014. Neoplasia*).

J'ai aussi participé à l'étude de la dérégulation de l'expression de micro-ARN par la protéine HBZ du HTLV-1, au niveau de clones lymphocytes T CD4+ issus de patients naturellement infectés par le virus (*Vernin C, Thénnoz M & al., en révision*).

Mon travail principal a été d'analyser les effets de l'infection par le HTLV-1 au niveau de la régulation de l'épissage alternatif de transcrits cellulaires. Ce travail a abouti à la rédaction de 2 articles en premier auteur, dont l'un est actuellement en soumission.

Dans ce manuscrit est présentée uniquement la partie concernant la dérégulation de l'épissage alternatif par le HTLV-1.



## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>PREMBULE .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>4</b>
<b>INDEX DES FIGURES.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>1/ Physiopathologie de l'infection à HTLV-1.....</b>	<b>10</b>
A/ Le rétrovirus HTLV-1.....	10
A.1/ Découverte et classification.....	10
A.2/ Epidémiologie du HTLV-1.....	10
a. Prévalence du HTLV-1.....	11
b. Modes de transmission.....	11
A.3/ Pathologies associées à l'infection par HTLV-1.....	12
a. La Leucémie T de l'Adulte (ATL).....	13
b. La paraparésie spastique tropicale / myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM).....	14
A.4/ Le virus HTLV-1.....	14
a. La particule virale.....	14
b. Le génome viral.....	15
B/ Mode de réplication du HTLV-1 <i>in vivo</i> et pathogénèse.....	17
B.1/ Tropisme du virus.....	17
a. Les récepteurs cellulaires.....	18
b. Les Lymphocytes T.....	18
c. Autres cellules cibles.....	19
B.2/ Réplication du virus <i>in vivo</i> : expansion clonale des cellules infectées.....	19
C/ Régulation de l'expression des gènes et oncogénèse associée à HTLV-1.....	22
C.1/ Régulation de l'expression des gènes viraux.....	22
a. Tax, un transactivateur transcriptionnel des gènes viraux.....	22
b. p13, p30 et HBZ, des trans-inhibiteurs de l'expression des gènes viraux.....	26
C.2/ Régulation de l'expression des gènes cellulaires.....	27
a. Tax : un oncogène multi-fonctionnel.....	27
i) Propriétés physicochimiques et domaines protéiques de Tax.....	28
ii) Localisation et modifications post-traductionnelles de Tax.....	29
α. Localisation cellulaire.....	29
β. Modifications post-traductionnelles de Tax.....	30
b. Effets de Tax sur les voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire et l'intégrité du génome.....	31
i) TAX et les points de contrôle du cycle cellulaire :.....	31
ii) Tax et l'apoptose.....	33
iii) Tax et l'intégrité du génome.....	34
α. Voies de réparation de l'ADN.....	34
β. Le centrosome.....	35
δ. Le système télomère/téломérase.....	36
c. Dérégulation de l'expression des gènes par Tax.....	36
i) Tax et les facteurs de transcription.....	37
α. CREB/ATF.....	37
β. NF-κB.....	37
δ. Facteur de réponse au sérum (SRF).....	39
ii) Régulation des enzymes modifcatrices de la chromatine.....	40
α. Histone acétyltransférase (HAT) et Histone déacétylase (HDAC).....	40
β. Histone méthyltransférase (HMT) et Histone déméthylase (HDM).....	40
δ. Le complexe Switch/Sucrose Non Fermentable (SWI/SNF).....	41
iii) Régulation de l'ARN polymérase II.....	42
<b>2/ Epissage Alternatif, HTLV-1 et Tax.....</b>	<b>42</b>
A/ Epissage alternatif.....	42

A.1/ Présentation .....	43
a. Epissage constitutif .....	43
b. Epissage alternatif .....	44
c. Rôles de l'épissage alternatif .....	44
i) Modifications qualitatives des ARNm .....	44
ii) Modification quantitative des ARNm .....	45
α. Couplage entre épissage alternatif et la dégradation des ARN non-sens .....	46
β. Polyadénylation alternative et microARN .....	47
A.2/ Mécanismes .....	48
a. Le spliceosome .....	48
b. Reconnaissance des sites d'épissage .....	51
c. Couplage entre épissage et transcription .....	53
A.3/ Régulation de l'épissage alternatif .....	55
a. Rôle du promoteur .....	55
b. Rôle de l'ARN polymérase II .....	56
i) Rôle du domaine C-terminal (CTD) .....	56
ii) Rôle de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II .....	58
c. Rôle du remodelage de chromatine .....	59
i) Rôle de la chromatine sur le recrutement des facteurs d'épissage .....	59
ii) Rôle de la chromatine sur la cinétique de l'ARN polymérase II .....	60
B/ Epissage alternatif et pathogenèse .....	61
B.1/ Epissage alternatif et cancer .....	61
a. Mutations des éléments cis-régulateurs .....	62
i) Mutations des sites accepteurs et donneurs d'épissage .....	62
ii) Mutation des séquences cis-régulatrices d'épissage .....	62
b. Dérégulation des facteurs trans-régulateurs de l'épissage .....	63
c. CD44, un gène modèle de l'épissage alternatif .....	65
B.2/ Approches thérapeutiques .....	67
a. Modulation thérapeutique de l'épissage alternatif .....	67
b. Le spliceosome : une nouvelle cible des drogues anti-tumoral .....	68
B.3/ Epissage alternatif et infections oncovirales .....	69
a. Redistribution des variants d'épissage dans les infections oncovirales .....	70
b. Dérégulation de l'expression des facteurs d'épissage par les protéines virales .....	71
c. Des protéines virales dans la machinerie d'épissage .....	71
i) Protéines SR codées par les oncovirus .....	71
ii) Interactions de protéines virales avec les facteurs SR .....	72
C/ HTLV-1 et épissage alternatif .....	73
C.1/ Dérégulation de l'épissage alternatif dans les cellules infectées par HTLV-1 .....	73
C.2/ Tax et épissage alternatif .....	75
<b>3/ Problématique et objectifs de la thèse .....</b>	<b>76</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>78</b>
<b>1/ Partie 1 : Les profils d'expression d'exons des cellules T-CD4+ infectées constituent des signatures spécifiques des phénotypes non-transformés et ATLL. ....</b>	<b>79</b>
A/ Introduction .....	80
B/ Résultats .....	81
B.1/ Modification de l'expression d'exons dans les cellules d'ATLL et des clones non transformés T CD4+ infectés par HTLV-1 .....	81
B.2/ Les dérégulations d'expression d'exons alternatifs signent l'état d'infection et de transformation des cellules .....	88
B.3/ Signification biologique des dérégulations d'exons .....	91
B.4/ Effet antiprolifératif de la Sudemycin E sur les lignées cellulaires transformées HTLV-1 positives .....	93
C/ Discussion .....	96
<b>2/ PARTIE 2 : L'activation de la voie NF-κB par la protéine Tax du HTLV-1 induit l'expression du variant d'épissage CD44v10 via un enrichissement de l'ARN polymérase II .....</b>	<b>99</b>
A/ Introduction .....	100

B/ Résultats .....	102
B.1/ Dérégulation de l'épissage alternatif cellulaire via l'activation de la voie NF-kB par Tax .....	102
B.2/ Régulation de l'expression de CD44 par Tax.....	110
B.3/ L'activation de la voie NF-kB par Tax induit le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau des exons variables de CD44 .....	117
B.4/ Tax, RelA et ARN polymérase II : des régulateurs de l'épissage alternatif de CD44 .....	121
C/ Conclusion.....	128
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>132</b>
<b>1/ Culture Cellulaire .....</b>	<b>133</b>
A/ Echantillons de patients .....	133
B/ Clonage en dilution limite des cellules T .....	133
C/ Cytométrie en Flux .....	133
D/ Culture des lignées cellulaires .....	134
E/ Transfections .....	134
F/ Test de prolifération MTT .....	134
<b>2/ Biologie moléculaire .....</b>	<b>135</b>
A/ Extraction d'ARN et transcription inverse .....	135
B/ Hybridation et analyse statistique des données de puces exon Affymetrix.....	135
C/ Réaction de polymérisation en chaine (PCR) .....	135
D/ Réaction quantitative de polymérisation en chaine (qPCR).....	136
E/ Immunoprécipitation de la chromatine.....	136
F/ Co-immunoprécipitation .....	137
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>138</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>143</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>177</b>

## INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. DISTRIBUTION DU HTLV-1 SUR LA TERRE. D'APRES (GESSAIN AND CASSAR 2012).	12
FIGURE 2. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU VIRION HTLV-1.	15
FIGURE 3. GENOME, ARNm ET PROTEINES DU HTLV-1. D'APRES (LAIRMORE ET AL. 2012).	16
FIGURE 4. TRANSACTIVATION DU LTR PAR TAX. D'APRES (CURRET ET AL. 2012).	23
FIGURE 5. MODELE D'INTERACTION ENTRE TAX ET LE COMPLEXE P-TEFB. D'APRES (CHO ET AL. 2007).	24
FIGURE 6. MODELE DE REGULATION DE L'INITIATION ET DE L'ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION DU VIRUS PAR LA REGULATION DE P-TEFB PAR TAX. D'APRES (ZHOU ET AL. 2006).	24
FIGURE 7. REGULATION DE L'EXPRESSION VIRALE PAR TAX ET REX. ADAPTEE D'APRES (NAKANO AND WATANABE 2012).	25
FIGURE 8. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DOMAINES FONCTIONNELS DE TAX. D'APRES (SHIRINIAN ET AL. 2013).	28
FIGURE 9. CO-LOCALISATION DE TAX AVEC LE FACTEUR D'EPISSAGE SC35. D'APRES (SEMMES AND JEANG 1996).	29
FIGURE 10. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TAX. ADAPTEE D'APRES (SHIRINIAN ET AL. 2013).	30
FIGURE 11. EFFETS DE TAX SUR L'ACCELERATION DU CYCLE CELLULAIRE. D'APRES (GRASSMANN ET AL. 2005).	32
FIGURE 12. INHIBITION DE P53 PAR TAX ET CES CONSEQUENCES SUR LA CELLULE HOTE.	34
FIGURE 13. INHIBITION DES VOIES DE REPARATION DE L'ADN PAR TAX.	35
FIGURE 14. ACTIVATION DE LA VOIE NF-KB. D'APRES (CHEN 2005).	38
FIGURE 15. ACTIVATION DES VOIES CANONIQUE ET NON CANONIQUE DE NF-KB PAR TAX. D'APRES (SHIRINIAN ET AL. 2013).	39
FIGURE 16. MODELE DE TRANSACTIVATION DU PROMOTEUR VIRAL PAR TAX. D'APRES (BOXUS ET AL. 2008).	41
FIGURE 17. STRUCTURE D'UN ARN PRE-MESSAGER.	43
FIGURE 18. EPISSAGE ALTERNATIF VS EPISSAGE CONSTITUTIF.	44
FIGURE 19. EPISSAGE ALTERNATIF ET REGULATION QUANTITATIVE DES ARN MESSAGER.	46
FIGURE 20. COMPOSITION PROTEIQUE ET STRUCTURE SECONDAIRE DES SNRNA DES SNRNP DU SPLICEOSOME HUMAIN. D'APRES (WILL AND LUHRMANN 2011).	48
FIGURE 21. REACTION D'EPISSAGE. D'APRES (CHEN AND CHENG 2012).	49
FIGURE 22. ASSEMBLAGE ET DESASSEMBLAGE DU SPLICEOSOME. D'APRES (WILL AND LUHRMANN 2011).	50
FIGURE 23. RECONNAISSANCE DES SITES D'EPISSAGE PAR LE SPLICEOSOME.	52
FIGURE 24. DIFFERENTES POSSIBILITES D'EPISSAGE ALTERNATIF D'UN ARN.	53
FIGURE 25. INTEGRATION DES PROCESSUS DE MATURATION DE L'ARN PENDANT LA TRANSCRIPTION DU GENE.	55
FIGURE 26. PHOSPHORYLATION DU CTD DE L'ARN POLYMERASE II AU COURS DE LA TRANSCRIPTION. ADAPTEE D'APRES (SIMS ET AL. 2004).	57
FIGURE 27. ROLE DE LA CINETIQUE D'ELONGATION DE L'ARN POLYMERASE II DANS LA REGULATION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF. D'APRES (DE LA MATA ET AL. 2010).	59
FIGURE 28. COUPLAGE ENTRE LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES ET L'EPISSAGE ALTERNATIF SUR LE GENE FGFR2. D'APRES (LUCCO ET AL. 2010).	60
FIGURE 29. CD44 GENE ET PROTEINE STRUCTURE.	66
FIGURE 30. RESTAURATION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF VIA L'UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDE ANTISENS (AON).	68
FIGURE 31. EFFET DE LA SPLICEOSTATIN A (SSA) SUR LA RECONNAISSANCE DU SITE 3' D'EPISSAGE. D'APRES (BONNAL ET AL. 2012).	69
FIGURE 32. DISTRIBUTION DES MODIFICATIONS D'EXPRESSION D'EXONS ENTRE LES CELLULES ATLL ET LES CLONES T CD4+ ISSUS DE PATIENTS INFECTES PAR HTLV-1.	84
FIGURE 33. VALIDATIONS DES EVENEMENTS D'EPISSAGE DANS LES CLONES T CD4+ INFECTES PAR HTLV-1.	85
FIGURE 34. VALIDATIONS DES EVENEMENTS D'EPISSAGE DANS LES CELLULES ATLL.	86
FIGURE 35. VALIDATIONS DES DEREGULATIONS D'EXPRESSION GLOBALE DE GENES DANS LES CLONES T CD4+ INFECTES PAR HTLV-1.	87
FIGURE 36. CLUSTER HIERARCHIQUE DES ECHANTILLONS BASE SUR L'EXPRESSION DES EXONS.	89
FIGURE 37. ANALYSE PAR RT-PCR SPECIFIQUE D'EXONS DE 6 ECHANTILLONS D'ATLL SUPPLEMENTAIRES.	90
FIGURE 38. ETUDE ONTOLOGIQUE DES GENES DEREGULES QUANTITATIVEMENT ET QUALITATIVEMENT DANS LES CLONES T CD4+ INFECTES AINSI QUE LES ATLL.	92
FIGURE 39. EFFET DE LA SUDEMYCIN E SUR LES LIGNEES INFECTEES PAR HTLV-1.	95
FIGURE 40. DISTRIBUTION DES MODIFICATIONS D'EXPRESSION D'EXONS DANS LES CELLULES HEK293T LTR-GFP EXPRIMANT TAX WT OU TAX M22.	105
FIGURE 41. VALIDATION DES EVENEMENTS D'EPISSAGE DANS LES CELLULES EXPRIMANT TAX WT ET TAX M22.	108
FIGURE 42. ANALYSE ONTOLOGIQUE DES GENES DEREGULES EN TRANSCRIPTION ET EN EPISSAGE DANS LES CELLULES EXPRIMANT TAX WT ET TAX M22.	109

FIGURE 43. INDUCTION DE L'EXPRESSION ET DE L'INCLUSION DES EXONS ALTERNATIFS DE CD44 PAR TAX WT DANS LES CELLULES HEK293T.....	112
FIGURE 44. ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DE CD44 PAR FACS.....	115
FIGURE 45. CORRELATION ENTRE L'EXPRESSION DE TAX ET L'EXPRESSION DE CD44V10 DANS LA LIGNEE MT2 AINSI QUE DES CLONES T CD4+ INFECTES PAR LE VIRUS HTLV-1.....	116
FIGURE 46. ENRICHISSEMENT DE TAX ET RNA POLYMERASE II SUR LE PROMOTEUR ET LA REGION CODANTE DE CD44 DANS LES CELLULES HEK293T. ....	118
FIGURE 47. PROFIL D'EXPRESSION DE L'ARN POLYMERASE II AU NIVEAU DU PROMOTEUR ET DE LA REGION CODANTE DE CD44 DANS LES CELLULES HEK293T.....	120
FIGURE 48. DISTRIBUTION DE TAX DANS LA SEQUENCE CODANTE DE CD44 DANS LES CELLULES HEK293T.....	122
FIGURE 49. CO-IMMUNOPRECIPITATION DE L'ARN POLYMERASE II, TAX ET RELA.....	123
FIGURE 50. DISTRIBUTION DE P65 (RELA) AU NIVEAU DU PROMOTEUR ET DE LA REGION CODANTE DE CD44 DANS LES CELLULES HEK293T.....	125
FIGURE 51. MODELE D'ETUDE DES EFFETS DE TAX ET DE NF-KB SUR LA REGULATION DU COUPLAGE TRANSCRIPTION/EPISSAGE DE CD44 DANS LES CELLULES HEK293T.....	127

## INTRODUCTION

## 1/ Physiopathologie de l'infection à HTLV-1

### A/ Le rétrovirus HTLV-1

#### A.1/ Découverte et classification

Le rétrovirus T lymphotrope de type 1 (HTLV-1) fut le premier rétrovirus humain découvert en 1980 par l'équipe du docteur Robert Gallo, à partir d'une lignée cellulaire dérivant d'un patient atteint d'un lymphome T cutané (Poiesz et al. 1980). En 1982, l'équipe de Mitsuaki Yoshida au Japon caractérisait le virus responsable de la leucémie T de l'adulte, qu'ils appelleront ATLTV pour Adult T-cell Leukemia Virus (Yoshida et al. 1982). C'est en 1984, par les travaux de Watanabe *et al.*, que HTLV et ATLTV ont été démontrés comme appartenant à la même famille de rétrovirus, les deltarétrovirus. Le nom HTLV pour Human T-cell lymphotropic virus fut conservé (Watanabe et al. 1984).

Le genre des deltarétrovirus se compose des virus HTLV-1, -2, -3 et -4, ainsi que leur contreparties simiennes (STLV) (Mahieux and Gessain 2011). Par leur degré d'homologie de séquences nucléotidiques, ces virus sont regroupés sous la famille des virus T-lymphotropes de primates (PTLV) (Watanabe et al. 1986). De cette famille se distingue le deltarétrovirus BLV, pour Bovine Leukemia Virus, découvert en 1975 (Gilden et al. 1975).

#### A.2/ Epidémiologie du HTLV-1

Alors que les modes de transmission du HTLV-1 ont été assez rapidement identifiés, la distribution du virus à l'échelle planétaire reste difficile à évaluer précisément. Aujourd'hui encore, nous ne disposons que d'estimation, le nombre réel de personnes infectées par le virus HTLV-1 est vraisemblablement plus important que ce que l'on pense.

#### a. Prévalence du HTLV-1

En 1993, une étude rapportait qu'environ 10 à 20 millions d'individus dans le monde étaient porteurs du virus HTLV-1 (de The and Bomford 1993). Vingt ans après, ces chiffres semblent être encore d'actualité car une étude récente réalisée par l'équipe d'Antoine Gessain donne une estimation de 5 à 10 millions d'individus infectés à l'échelle mondiale, et précise que les données épidémiologiques de la Chine, l'Inde, le Maghreb et l'Afrique de l'Est sont encore aujourd'hui méconnues (Gessain and Cassar 2012).

La séroprévalence est très hétérogène en fonction des régions étudiées. Il existe des régions dites endémiques, avec une séroprévalence supérieure à 1-5% telles que le sud-ouest du Japon, les Caraïbes, l'Amérique du Sud (Brésil, Argentine, Colombie, Pérou), l'Afrique Sub-Saharienne, l'Iran et la Mélanésie. Dans les régions non endémiques telles que les Etats-Unis et l'Europe, la séroprévalence est inférieure à 0,03%, et les patients infectés par HTLV-1 sont principalement des immigrants provenant des zones endémiques (**FIGURE 1**). En plus de la variabilité géographique de la prévalence du virus, celle-ci varie aussi en fonction de l'âge et du sexe de la population étudiée. La prévalence augmente d'une manière générale avec l'âge des individus, et est plus importante chez les femmes que chez les hommes (Verdonck et al. 2007).

#### b. Modes de transmission

Les principaux modes de transmission sont :

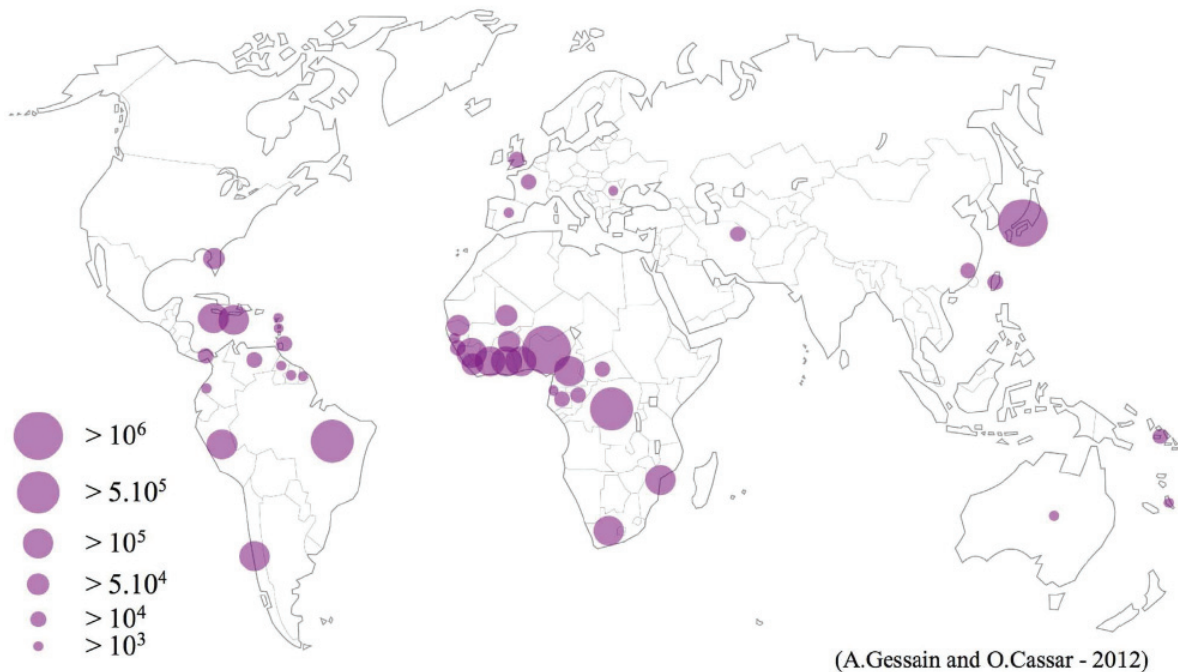
(i) le passage de la mère à l'enfant, notamment lors de l'allaitement, qui se produit dans 20% des cas lors d'un allaitement prolongé (Wiktor et al. 1997).

(ii) la transmission par voie sexuelle, qui se ferait préférentiellement dans le sens de l'homme vers la femme, ce qui pourrait expliquer la plus forte prévalence dans la population féminine (Murphy et al. 1996).

(iii) et la transmission par voie sanguine lors de transfusion de sang. En effet, environ la moitié des receveurs de sang contaminé par HTLV-1 deviennent séropositifs deux mois après la transfusion (Manns et al. 1992). L'utilisation de seringues usagées



chez les toxicomanes est aussi une source importante de transmission du virus dans les zones non endémiques (Feigal et al. 1991).



**Figure 1. Distribution du HTLV-1 sur la Terre.** D'après (Gessain and Cassar 2012).

Estimation du nombre de personnes infectées par le HTLV-1 à l'échelle mondiale. Ces résultats sont basés sur des données épidémiologiques d'environ 1,5 million d'individus provenant d'études sur des femmes enceintes et/ou des donneurs de sangs et/ou différentes populations adultes.

### **A.3/ Pathologies associées à l'infection par HTLV-1**

Comme pour toute infection, l'organisme va mettre en place des moyens de défense contre le virus HTLV-1. Celui-ci mettra lui aussi en place des mécanismes d'échappement au système immunitaire, lui permettant de persister *in vivo*. HTLV-1 est directement associé au développement tumoral chez l'homme. Il est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL ou ATL) (Uchiyama et al. 1977; Poiesz et al. 1980). De plus, HTLV-1 est aussi associé à des maladies inflammatoires telles que la paraparésie spastique tropicale (TSP) (Gessain et al. 1985), des uvéites, des dermatites infectieuses, des polymyosites, des arthrites, des thyroïdites et des alvéolites (LaGrenade et al. 1990; Kawai et al. 1992; Kimura 1992; Pinheiro et al. 1995).

#### a. La Leucémie T de l'Adulte (ATL)

L'ATL est une hémopathie maligne lymphoïde due à la prolifération aberrante d'un clone cellulaire T CD4+ porteur d'un provirus HTLV-1. Les patients atteints d'ATL sont majoritairement ceux qui ont été infectés à la naissance (Proietti et al. 2005). La co-infection par *Strongyloides stercoralis* est un cofacteur de l'ATL (Gabet et al. 2000). L'ATL survient chez 1-5% des patients infectés par HTLV-1, après une période de latence clinique de 30 à 60 ans. Durant cette période dite pré-leucémique, on peut observer une expansion clonale des cellules infectées, associée à une instabilité génétique (Mortreux et al. 2003). Le diagnostic de l'ATL est principalement basé sur la présence chez le patient, d'anticorps dirigés contre le virus HTLV-1, ainsi que la mise en évidence de l'intégration monoclonale du virus dans les cellules tumorales (Yasunaga and Matsuoka 2007).

Les ATL ont été classifiées en 4 sous-types : forme aiguë (60% des cas), chronique (15%), indolente (5%) et lymphomateuse (20%) (Tsukasaki et al. 2009). Les médianes de survie ne dépassent pas l'année pour les formes les plus agressives (aiguë et lymphomateuse). Pour les 4 formes d'ATL, une intégration du provirus au niveau des cellules tumorales est mise en évidence. La partie LTR 5' du provirus est souvent délétée ou bien hyperméthylée, ce qui explique la faible expression du virus observée *in vivo*, ainsi que l'échappement des cellules d'ATL au système immunitaire (Furukawa et al. 1995). Les chimiothérapies conventionnelles sont peu efficaces contre les ATL. Une méta-analyse sur 254 patients ATL regroupant plusieurs études indépendantes, a révélée que l'utilisation du traitement antiviral Zidovudine et interféron  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) permettait de prolonger la vie des patients (Bazarbachi et al. 2010). La combinaison Zidovudine IFN $\alpha$  présente encore aujourd'hui les meilleurs résultats. L'ajout de l'arsenic en combinaison avec la Zidovudine et l'IFN $\alpha$  semble prometteur (Kchour et al. 2013). Lorsque les patients rechutent ou bien résistent au traitement, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques permet de réduire significativement la charge provirale, avec un taux de rémission complet à 3 ans de 51% (Kanda et al. 2012).

## b. La paraparésie spastique tropicale / myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM)

Avec 2-3% des individus infectés, la TSP/HAM est la maladie inflammatoire chronique associée à HTLV-1 la plus importante en terme d'incidence. Elle se développe en générale chez les patients vers 40 – 50 ans, bien que quelques cas chez des jeunes patients ont été observés (Kendall et al. 2009). La TSP/HAM est surtout associée à la contamination par transfusions sanguines ou bien relations sexuelles. Elle touche plus les femmes que les hommes (Gessain and Mahieux 2012). La TSP/HAM est une myélopathie chronique qui se traduit par une faiblesse musculaire, une hyperréflexie et une spasticité des membres inférieurs. Elle est caractérisée par l'infiltration de cellules lymphocytaires et macrocytaires qui induisent des lésions de la moelle épinière. Ces lésions touchent en particulier la substance blanche de la moelle épinière, avec une démyélinisation et une dégénération axonale.

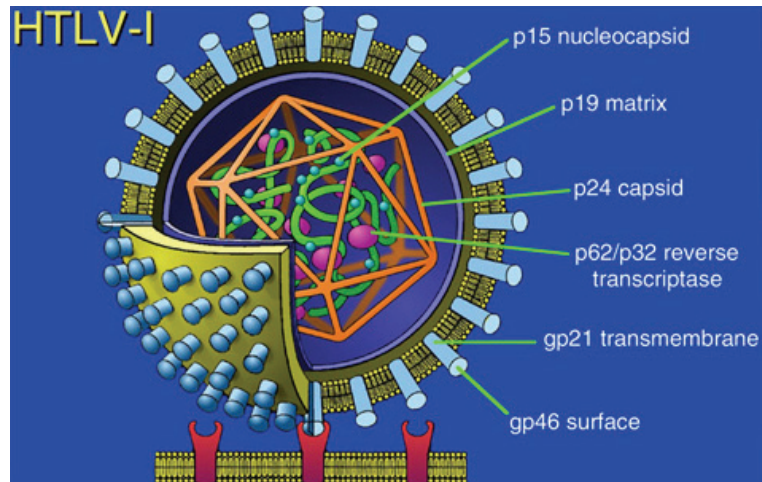
Quelques facteurs de risque ont pu être mis en évidence favorisant le développement de la TSP/HAM. La charge provirale est un facteur de risque important (Manns et al. 1999). Des facteurs génétiques pourraient également favoriser l'apparition de la maladie (Nagai et al. 1998). De plus, il semblerait que le site d'intégration du provirus dans une région transcriptionnellement active favoriserait l'expression du provirus et le développement de la TSP/HAM (Meekings et al. 2008). Finalement, certains haplotypes HLA semblent aussi jouer un rôle dans le développement de la pathologie, avec par exemple un effet protecteur du HLA-A\*02, alors que les patients avec un HLA-B\*5401 présenteraient un risque accru (Jeffery et al. 1999). Actuellement, aucune thérapie ne permet une rémission prolongée de la TSP/HAM (Oh and Jacobson 2008).

### A.4/ Le virus HTLV-1

#### a. La particule virale

HTLV-1 est un virus enveloppé d'environ 75 nm de diamètre (Grigsby et al. 2010). L'enveloppe du virus est d'origine cellulaire, emportée lors du bourgeonnement du virion. Elle se compose d'une bicouche phospholipidique ainsi que de glycoprotéines virales transmembranaires (TM ou gp21) et de surface (SU ou gp46) (**FIGURE 2**). Sous

cette enveloppe, les protéines de matrice (p19), en lien avec la capsid virale (p24), permettent l'ancrage à la membrane plasmique, l'assemblage et le bourgeonnement (Wang et al. 2004). La capsid virale renferme la nucléocapside (p15) contenant le génome viral, ainsi que les protéines virales (Morcock et al. 2000) **(FIGURE 2)**.



**Figure 2. Représentation schématique du virion HTLV-1.**

Le génome du HTLV-1 est constitué de deux molécules d'ARN identiques (en vert), chacune associée à la protéine de nucléocapside (p15) ainsi qu'à la transcriptase inverse (p62). Ce complexe ribonucléoprotéique est entouré par une capsid (p24) qui est reliée à l'enveloppe virale par les protéines de matrice (p19). L'enveloppe, d'origine cellulaire, est constituée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont insérés les complexes glycoprotéiques d'enveloppe d'origine virale (gp21 et gp46).

#### b. Le génome viral

Le génome d'HTLV-1 est composé de 2 copies d'ARN simple brin de 8,5 kb, coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Aux extrémités, se trouve une région de séquences répétées (R), ainsi qu'une région unique à chaque extrémité (U5 en 5' et U3 en 3') **(FIGURE 3)**. Comme tous les virus, le génome viral code les protéines de structure Gag et Env, ainsi que les enzymes virales, la protéase (codé par le gène Pro), l'intégrase et la transcriptase inverse (codées par le gène pol). HTLV-1 est appelé rétrovirus complexe car il possède une région codante supplémentaire en 3' nommée pX **(FIGURE 3)**.

Suite à l'infection, le génome viral va subir une transcription inverse puis va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. La reverse transcription du génome ARN aboutit à la formation de séquences identiques aux extrémités du provirus que l'on appelle les LTR

(long terminal repeat) **(FIGURE 3)**. Ces LTR sont les substrats de l'intégrase et permettent l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte. Ces LTR sont riches en éléments de réponses aux facteurs de transcription et servent de promoteurs pour l'expression des gènes viraux. Ils contiennent aussi les sites de terminaison de la transcription et de polyadénylation. La séquence provirale constitue la matrice de production des protéines virales et des ARN génomiques essentiels à l'encapsidation et à la formation de nouvelles particules virales.

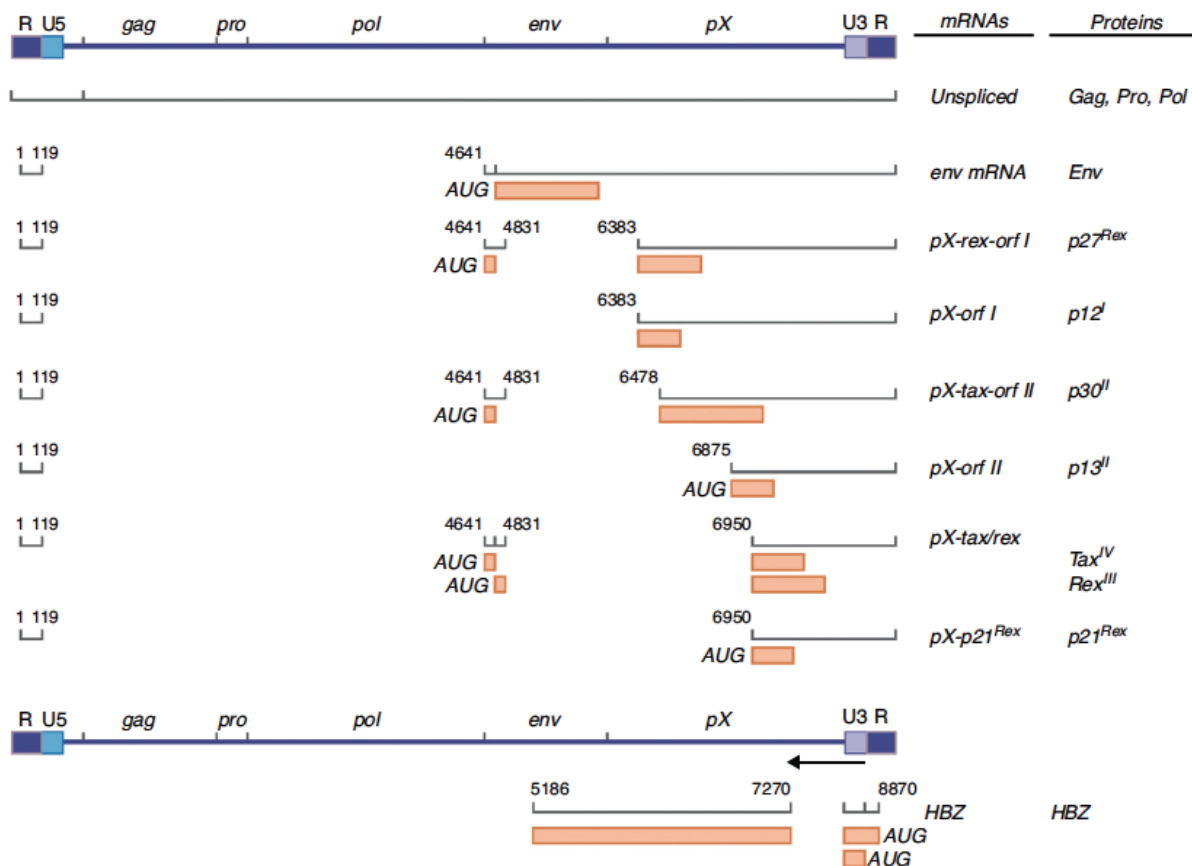


Figure 3. Génome, ARNm et protéines du HTLV-1. D'après (Lairmore et al. 2012).

Schéma représentant le génome du HTLV-1 (en haut), ainsi que les produits d'expression du provirus.

L'ARN de la taille du génome viral peut aussi être traduit en plusieurs protéines grâce à la présence de plusieurs cadres de lecture. La traduction à partir du premier cadre de lecture produit la protéine Gag (p55). Le décalage du cadre de lecture au niveau du premier codon stop induit la traduction de la protéine de fusion Gag-Pro. Un deuxième décalage du cadre de lecture permet la traduction de la protéine Pol en fusion avec Gag-Pro. Le clivage de Gag va donner la protéine de matrice (p19), de capsid (p24) et de la

nucleocapside (p24). Le clivage de Gag-Pro donnera en plus la protéase virale. Finalement, le clivage de Gag-Pro-Pol donnera en plus la transcriptase inverse et l'intégrase. La protéine Env (gp62) sera traduite à partir d'un ARNm simplement épissé. Env sera aussi clivée pour donner les glycoprotéines transmembranaires (gp21) et de surface (gp46).

La région pX est quand à elle composée de 4 cadres de lecture ouverts (ORF), codant les protéines régulatrices du virus (Kannian and Green 2010). Les ORF I et II vont donner les protéines p12, p30 et p13. La protéine p12 peut subir un clivage qui donnera la protéine p8 (Fukumoto et al. 2009). Les protéines Rex et Tax sont traduites à partir d'un même ARNm doublement épissé, à partir de l'ORF III et l'ORF IV respectivement. Une protéine Rex-like de 21kDa (p21), est aussi observée *in vivo* (**FIGURE 3**).

La transcription du provirus est aussi possible en anti-sens. Elle a été mise en évidence à la fin des années 1980 (Larocca et al. 1989), mais ce n'est qu'au début des années 2000 que la traduction d'un transcrite anti-sens a été prouvée par l'équipe de Jean Michel Mesnard à Montpellier (Gaudray et al. 2002). La protéine HBZ (HTLV-1 Basic Leucine Zipper Factor) est codée par le transcrite anti-sens du HTLV-1. Deux isoformes sont traduites à partir d'un ARNm épissé ou non. L'isoforme la plus abondante est celle de 206 acides aminés encodés par le transcrite épissé (Yoshida et al. 2008) (**FIGURE 3**).

## **B/ Mode de répllication du HTLV-1 *in vivo* et pathogénèse**

### ***B.1/ Tropisme du virus***

*In vitro*, HTLV-1 est capable d'infecter les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les monocytes, mais aussi des cellules endothéliales, gliales et épithéliales. Cependant, *in vivo*, les réservoirs majeurs du virus sont les cellules T CD4+ et T CD8+ (Manel et al. 2005).

### a. Les récepteurs cellulaires

Il a été montré que les protéines de l'enveloppe du HTLV-1 interagissent avec 3 récepteurs membranaires (Manel et al. 2003; Jones et al. 2005; Ghez et al. 2006) . Le virus interagit tout d'abord avec les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG). Cette interaction va permettre le recrutement de la neuropiline 1 (NRP-1). Un changement de conformation va permettre ensuite l'interaction avec le transporteur de glucose GLUT1 (Pique and Jones 2012).

Deux modèles non exclusifs ont été proposés pour expliquer l'entrée du virus HTLV-1 dans la cellule hôte. Le premier est celui dit modèle de la synapse virologique. La synapse étant une zone d'adhésion entre cellule infectée et non infectée, favorisant ainsi le passage de particules virales (Igakura et al. 2003). Ce mode de transmission est dépendant de la repolarisation du cytosquelette induite par Tax (Mazurov et al. 2010). Le second modèle fait intervenir une structure extracellulaire similaire à des biofilms. Ces derniers permettent le stockage de particules virales infectieuses autour de la cellule infectée, permettant ainsi la mise en contact direct des virions avec les cellules saines avoisinantes. Les virions sont ensuite intégrés à la cellule saine par endocytose (Pais-Correia et al. 2010).

### b. Les Lymphocytes T

Le virus HTLV-1 est retrouvé *in vivo* au niveau des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Nagai et al. 2001; Sibon et al. 2006). La charge provirale est cependant plus importante dans les cellules T CD4+ que les CD8+.

HTLV-1 a été montré comme infectant principalement les cellules T CD4+ activées, porteurs du marqueur CD25 à leur surface (Yamano et al. 2004). Parmi les cellules T CD4+ activées : les lymphocytes mémoires présentant le marqueur CD45RO (Richardson et al. 1990) ainsi que les lymphocytes T régulateurs portant le marqueur CCR4 (Yoshie et al. 2002). Deux sous-populations de cellules portent ce marqueur, les Th2 et les cellules T régulatrices (Treg). Les cellules Treg, dont un des marqueurs est le facteur de



transcription Foxp3, semblent être infectées de façon importante par le virus (Satou et al. 2012).

### c. Autres cellules cibles

A moindre niveau, le virus a été détecté au sein de lymphocytes B, de cellules T Natural Killer invariantes (iNKT), et des cellules dendritiques (Koyanagi et al. 1993) (Azakami et al. 2009). L'infection des cellules dendritiques par le virus HTLV-1 est très intéressante car ce sont des médiateurs de la réponse T-cytotoxiques *via* notamment leur interaction avec les cellules T CD4+ lors de l'infection virale. Il a été montré *in vitro* que les cellules dendritiques infectées par HTLV-1 sont capables de transmettre le virus aux cellules T CD4+, suggérant qu'elles puissent jouer un rôle lors de la primo-infection (Jones et al. 2008).

## **B.2/ Réplication du virus *in vivo* : expansion clonale des cellules infectées**

L'infection par HTLV-1 se caractérise par l'existence de charges provirales élevées aux stades symptomatique et asymptomatique de l'infection, ainsi que par une grande stabilité génétique du virus. En comparaison au HIV, le génome du HTLV-1 est très stable, alors que leur transcriptase inverse présente en taux d'erreurs assez proche. L'explication se trouve dans le mode réplcatif original qu'utilise HTLV-1 *in vivo*. En effet, HTLV-1 se réplique majoritairement par l'expansion clonale de la cellule hôte (Wattel et al. 1996), ce qui lui permet de bénéficier du système de réplcation de l'ADN cellulaire, beaucoup plus fidèle que la transcriptase inverse d'origine virale. Au cours des années 1990, le développement des techniques de PCR inverse (IPCR) et de PCR avec ligation d'oligonucléotides (LMPCR), permettant d'amplifier le LTR 3' du virus flanqué de son site d'intégration, a permis de caractériser le mode réplcatif d'HTLV-1 (Wattel et al. 1995; Cavrois et al. 1998; Cavrois et al. 2000; Mortreux et al. 2001). Ainsi, il a été démontré qu'HTLV-1 se réplique majoritairement par l'expansion clonale de sa cellule hôte, et ce, quel que soit le stade de l'infection, ATLL, TSP/HAM ou asymptomatique. Les profils réplcatifs obtenus sont très souvent caractéristiques du statut clinique de l'individu étudié. Au stade asymptomatique de l'infection, le profil de réplcation du virus est dit polyclonal, qui correspond à la présence d'un grand nombre de clones de



faibles ampleurs. Au stade leucémique, on observe souvent un clone majoritaire, représentant jusqu' à 90% ou plus de la charge provirale, associé à la présence de forme minoritaire de très faible ampleur. Ce type de réplication est alors appelé réplication monoclonal. L'apport de la technologie à haut débit, telle que le séquençage à haut débit, a permis de confirmer ces résultats sur un panel plus important de patients (Meekings et al. 2008; Gillet et al. 2011; Cook et al. 2012).

Bien que les deux répertoires de cellules T CD4+ et CD8+ soient en expansion clonale, une étude au laboratoire a montré que le nombre moyen de clones en expansion était plus important chez les cellules T CD4+ que chez les cellules T CD8+ (Sibon et al. 2006). Cela explique la plus forte charge provirale dans le répertoire de cellules T CD4+ que de cellules T CD8+. Aucune différences significatives d'expression de l'ARNm Tax ou de la protéine virale p19 n'ont été observées entre les clones T CD4+ et T CD8+ infectés. Par contre, au niveau cytotologique, la présence de cellules géantes multinucléées était significativement plus importante dans les cellules exprimant Tax et plus particulièrement dans les clones T CD4+ infectés. Les clones T CD4+ infectés se caractérisent également par la présence de ponts chromatinien internucléaires dus à une ségrégation anormale des chromosomes. Les mécanismes sous-tendant l'expansion clonale *in vivo* sont différents selon le phénotype lymphocytaire : les lymphocytes T CD4+ infectés sont mis en cycle alors que les lymphocytes T CD8+ infectés résistent à l'apoptose (Sibon et al. 2006). Un travail réalisé au laboratoire par la suite, a pu démontré que le phénotype préleucémique des cellules T CD4+ infectées ainsi que le patron d'expansion clonale des cellules T CD4+ et CD8+ sont sélectionnés *in vivo* (Zane et al. 2009). En effet, en comparant les effets d'une infection expérimentale récente (1 mois) aux cellules T CD4+ et CD8+ provenant de patients infectés depuis >6-26 ans, il apparaît que les clones HTLV-1 positifs *in vivo*, sont sélectionnés pour leur expression de Tax. Les cellules infectées T CD4+ sont sélectionnées pour leur mise en cycle alors que les cellules T CD8+ infectées et les cellules T CD4+ non-infectées sont négativement sélectionnées pour ce processus (Zane et al. 2010a). En comparaison, le retard d'apoptose lié à l'infection des cellules T CD8+ était identique dans les clones infectés *in vitro* et *in vivo*. Cet effet d'HTLV-1 sur les cellules T CD8+ *in vivo* a été relié à la surexpression du facteur anti-apoptotique cIAP-2 corrélée à l'expression de Tax (Zane et al. 2010b). De plus, l'infection par HTLV-1 s'accompagne de modifications de l'activité de

la télomérase. A la phase préleucémique de l'infection, comparée à leurs contreparties non infectées, les cellules T CD4+ infectées présentent des défauts d'activation de la télomérase lorsqu'elles sont activées par la PHA. Ces effets sont corrélés à une surexpression de Tax. Par ailleurs, les cellules T CD4+ infectées activées, et non leurs contreparties T CD4+ et T CD8+ non infectées, répriment l'expression des gènes des protéines télomériques TRF1, TPP1, TANK1, POT1, DNA-PKc, et Ku80. Les cellules infectées et non infectées de porteurs HTLV-1 partagent des dérégulations transcriptionnelles communes des gènes du télosome, consistant avec un patron de sénescence prématurée. En contraste, les cellules d'ATL présentent une activité télomérase élevée avec des profils d'expression des gènes du télosome similaires aux cellules T CD4+ non infectées. Ces données indiquent que des modifications télomériques accompagnent l'expansion clonale des cellules T CD4+ infectées et peuvent participer à l'immunosuppression, l'initiation et la progression tumorale (Zane et al. 2012).

En réaction à l'infection virale, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sécrètent une grande quantité d'interférons de type I (IFN-I)  $\alpha$  et  $\beta$  (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) pouvant induire la mort des cellules infectées par l'expression d'un nombre important de ligand TRAIL (Tumor Necrosis Factor related Apoptosis Inducing Ligand) (Colisson et al. 2010). Les cellules NK (Natural Killer) peuvent inhiber le développement de la tumeur *in vivo*, comme il a été montré chez la souris SCID (Stewart et al. 1996). Il a été montré une corrélation inverse entre la charge provirale et la fréquence des cellules iNKT (invariant NKT) chez les patients asymptomatiques et TSP/HAM, suggérant une réponse immunitaire de la part de ces cellules contre le virus HTLV-1 (Azakami et al. 2009). De plus, il existe chez les patients une réponse humorale, *via* la sécrétion d'anticorps contre les protéines virales (Manns et al. 1999; Enose-Akahata et al. 2013). Malgré la présence de ces anticorps, leur efficacité *in vivo* est mal connue. La réponse immunitaire adaptative la plus efficace contre le HTLV-1 est la réponse à médiation cellulaire. En effet, les CTL (Cytotoxic T lymphocytes) dirigés contre le virus sont abondant chez les patients (Jacobson et al. 1990; Parker et al. 1992).

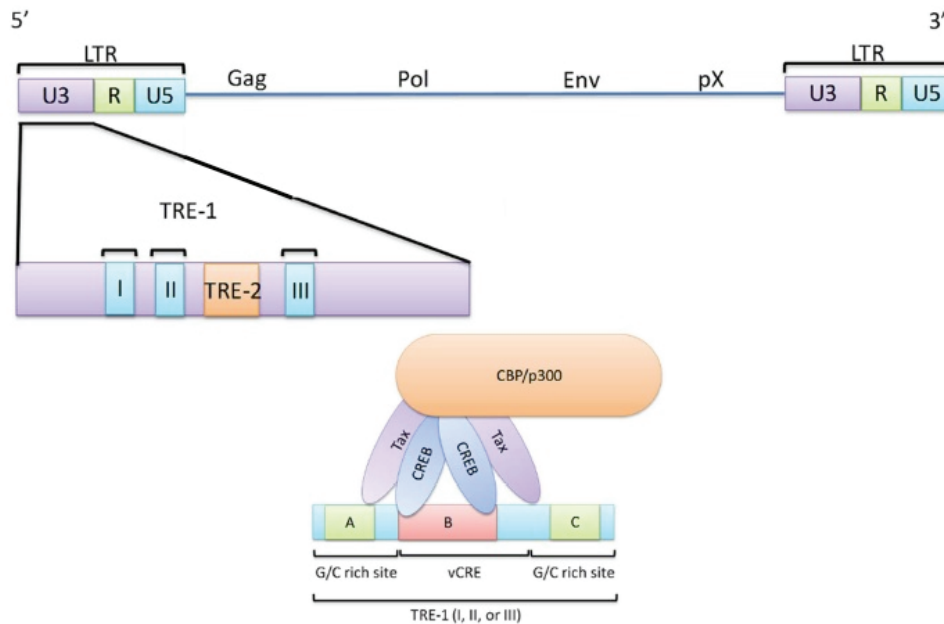
## C/ Régulation de l'expression des gènes et oncogène associée à HTLV-1

De nombreuses études à l'échelle du génome ont mis en évidence une importante dérégulation transcriptionnelle au sein des cellules infectées par HTLV-1, transformées ou non (Harhaj et al. 1999; de La Fuente et al. 2000; Ruckes et al. 2001; Pise-Masison et al. 2002; Sasaki et al. 2005; Pise-Masison et al. 2009; Iqbal et al. 2010; Olieri et al. 2010; Tattermusch et al. 2012). Les protéines virales Tax, et plus récemment HBZ, ont été identifiées comme étant responsables en grande partie de ces dérégulations. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement à l'oncoprotéine Tax d'HTLV-1.

### C.1/ Régulation de l'expression des gènes viraux

#### a. Tax, un transactivateur transcriptionnel des gènes viraux

L'étude de la cinétique d'expression du provirus *in vivo* indique que les premiers transcrits synthétisés sont ceux codant les facteurs Tax et Rex (Rende et al. 2011). La synthèse protéique de Tax permet la transactivation de l'expression des gènes viraux (**FIGURE 4**) (Seiki et al. 1985). Au niveau de la région U3 du LTR 5' proviral, l'homodimère Tax a la capacité de recruter les protéines CREB/ATF (CRE-Binding/Activating Transcription Factors) au niveau des séquences TRE-1 (Tax-Responsive Element) (Tie et al. 1996). La formation du complexe lié à l'ADN, va permettre le recrutement de co-activateurs tels que CBP (CREB Binding Protein)/p300 (Kwok et al. 1996) et PCAF (p300/CBP Associated Factor) (Jiang et al. 1999). Le recrutement de CBP/p300 se fait par l'interaction simultanée de Tax et CREB sur 2 régions distinctes du domaine KIX de CBP/p300 (Ramirez and Nyborg 2007). Via leur activité type histone acétyl-transférase, ces co-activateurs vont permettre la décondensation de la chromatine au niveau de la région promotrice du virus, favorisant ainsi le recrutement de la machinerie de transcription incluant l'ARN polymérase II (Lu et al. 2002). De plus, Tax interagit avec l'histone déacétylase HDAC-1 et empêche son action sur les histones localisés au promoteur viral, renforçant ainsi l'expression du virus (Lu et al. 2004).



**Figure 4. Transactivation du LTR par Tax.** D'après (Curren et al. 2012).

Schéma représentant l'activation du LTR du HTLV-1 *via* Tax. Au niveau des sites TRE-1 localisés sur la région U3 du LTR, Tax recrute l'homodimère CREB. Le complexe ADN/Tax/CREB permet le recrutement de CBP/p300, induisant la décondensation de la chromatine.

Les effets de Tax au niveau du LTR 5' ne se limitent pas au recrutement de facteurs de transcription. En effet, Tax interagit avec la RNA-binding protéine SRL300. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré le recrutement de SRL300 par Tax sur le promoteur viral. L'inhibition de SRL300 par siRNA abolit l'induction de l'expression du virus par Tax (Youn et al. 2003). De plus, des travaux récents ont montré que Tax était également capable d'influencer l'étape d'élongation de la transcription. Des modifications post-traductionnelles de l'ARN polymérase II au niveau de son domaine C terminal (CTD), régulent la processivité de cette dernière. Notamment, la phosphorylation des sérines en position 2 du CTD par le complexe P-TEFb (Positive Transcription elongation Factor b) induit l'élongation de la transcription. P-TEFb est composé de la cycline T1 et de CDK9 (Cyclin-dependent kinase). Cette dernière est une kinase qui a pour substrat la sérine en position 2 du CTD de l'ARN polymérase II. Tax agit sur la régulation du complexe P-TEFb *via* son interaction avec sa sous unité cycline T1 (Zhou et al. 2006). Tax rentre en compétition avec Brd4 pour la fixation de la cycline T1, et activer le complexe P-TEFb (Cho et al. 2007) (**FIGURE 5**). Tax induit donc indirectement la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II, induisant ainsi l'élongation de la transcription (**FIGURE 6**). Finalement,

en interagissant avec le facteur BRG1 du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non Fermentable), Tax facilite le passage de l'ARN polymérase II en remodelant les nucléosomes (Easley et al. 2010).

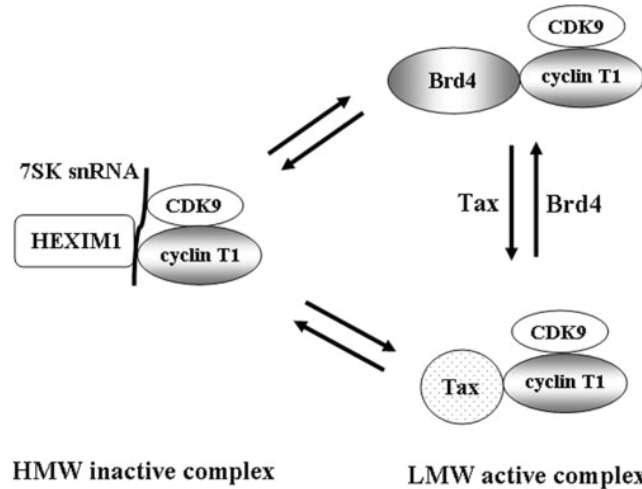


Figure 5. Modèle d'interaction entre Tax et le complexe P-TEFb. D'après (Cho et al. 2007).

Tax est associée au complexe P-TEFb *via* son interaction avec la cyclin T1. L'interaction Tax/cyclin T1 inhibe l'interaction BRD4/cyclin T1, suggérant qu'il existe 2 complexes P-TEFb activés aux niveaux des cellules exprimant Tax.

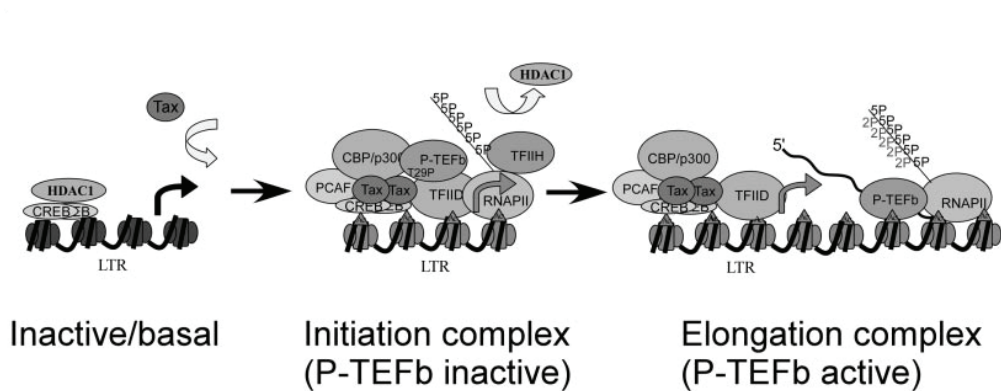
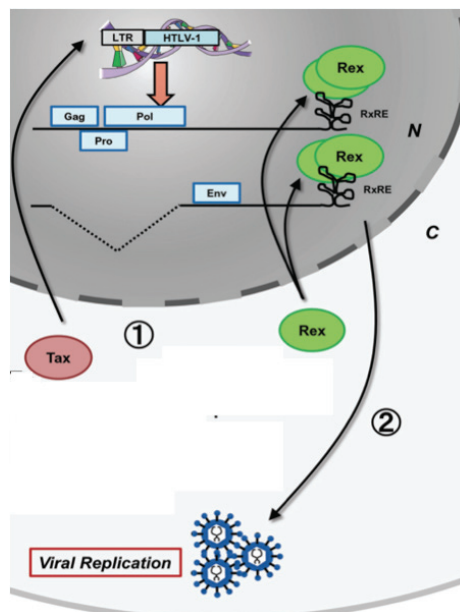


Figure 6. Modèle de régulation de l'initiation et de l'élongation de la transcription du virus par la régulation de P-TEFb par Tax. D'après (Zhou et al. 2006).

Tax recrute P-TEFb au niveau du promoteur viral et induit l'autophosphorylation de sa sous unité catalytique CDK9 (T29P sur le schéma). La phospho-CDK9 étant inactive, cela va permettre la mise en place du complexe d'initiation de la transcription en limitant la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II. Par la suite, la CDK9 va être déphosphorylée par une phosphatase, ce qui va permettre la phosphorylation de l'ARN polymérase II sur ces sérines 2 (2P sur le schéma), induisant ainsi le départ du promoteur et l'élongation de la transcription.

Alors que la protéine Tax joue un rôle central dans l'activation de la transcription du virus, la protéine Rex apparaît influencer l'expression du virus au niveau post-transcriptionnel. En effet, Rex permet l'export du noyau des ARN non ou mono-épissés, et donc aboutir à la traduction des protéines de structures, ainsi que les enzymes virales **(FIGURE 7)** (Hidaka et al. 1988). Rex interagit directement avec les ARNm présentant une structure particulière en 3' appelée RxRE, composée de 4 tige-boucles et d'une longue tige (Seiki et al. 1988; Toyoshima et al. 1990). Le facteur d'épissage hnRNP A1 entre en compétition avec Rex pour la fixation du RxRE, régulant ainsi l'export des transcrits viraux non épissés (Dodon et al. 2002). Rex favoriserait donc la formation de nouveaux virions, en induisant l'expression des protéines structurales et enzymatiques. Rex a aussi été impliquée dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnel des gènes cellulaires. En effet, Rex a été impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif du gène Fyn ; l'expression de Rex dans la lignée cellulaire Jurkat induit l'augmentation de l'expression de l'isoforme FynB au détriment de l'isoforme FynT (Weil et al. 1999). De plus, Il a été montré que Rex augmentait la demi-vie de l'ARNm de l'IL-2R $\alpha$  (Kanamori et al. 1990).



**Figure 7. Régulation de l'expression virale par Tax et Rex.** Adaptée d'après (Nakano and Watanabe 2012).

1/ Tax active l'expression du provirus *via* son activité au niveau du LTR viral. 2/ Rex exporte activement les ARNs viraux non épissés, favorisant l'expression des protéines structurales du virus, et donc la formation de nouveaux virions.

## b. p13, p30 et HBZ, des trans-inhibiteurs de l'expression des gènes viraux

L'expression du virus est quasi-indétectable à la phase chronique de l'infection, ce qui permet d'expliquer en partie l'échappement du virus à la pression du système immunitaire. Des phénomènes cellulaires tels que la méthylation ou la délétion du LTR 5' sont mis en cause (Neto et al. 2011; Sibon et al. 2013). Cependant les protéines virales p13, p30 et HBZ sont également capables de contrôler négativement l'expression virale. En effet, la protéine p13 interagit directement avec Tax, diminuant ainsi son interaction avec CBP/p300 et donc son effet activateur sur la transcription du virus (Andresen et al. 2011). La protéine p30 quant à elle entre en compétition avec Tax pour la fixation du complexe CBP/p300, inhibant ainsi la formation du complexe actif Tax/CBP/p300 (Zhang et al. 2001). p30 est aussi capable de séquestrer dans le noyau les ARNs tax/rex, réprimant ainsi leur expression au niveau protéique. Cela a pour conséquence une diminution de l'expression du virus (Nicot et al. 2004). HBZ montrent de nombreuses fonctions antagonistes à celles de Tax. Comme Tax, HBZ interagit avec les facteurs CREB mais n'est pas capable de les recruter au niveau du promoteur viral sur les boîtes TRE-1 (Lemasson et al. 2007), limitant ainsi par compétition les effets trans-activateurs de Tax. Egalement comme Tax, HBZ interagit avec le complexe CBP/p300 et masque le site de fixation de CBP/p300 à Tax, agissant là encore comme un inhibiteur de l'expression des gènes viraux (Clerc et al. 2008).

Ces mécanismes de rétrocontrôle de l'expression du virus pourraient participer à maintenir la faible expression virale qui caractérise les cellules infectées *in vivo* et contribuer ainsi à l'échappement des cellules infectées à la pression de la réponse T cytotoxique. Il est aussi important de noter que bien qu'indispensable à l'établissement d'une infection chronique, l'expression de Tax *in vivo* n'est que très rarement retrouvée dans les cellules d'ATLL indiquant que Tax est dispensable au maintien du phénotype tumoral (Ratner et al. 2000; Bellon et al. 2010; Inoue et al. 2013). Outre les effets *in vitro* des facteurs viraux nommés ci-dessus, l'extinction de l'expression de Tax a été reliée *in vivo* à la mutation de sa séquence nucléotidique, à la méthylation du LTR5' ou encore à la perte de large région provirale en 5' (Takeda et al. 2004). Ces événements pourraient être le résultat d'une longue sélection clonale au cours de la phase asymptomatique de l'infection. Le transcrit anti-sens HBZ est retrouvé quant à lui à tous les stades de



l'infection et plus particulièrement de façon abondante dans les cellules ATLL ou il est parfois le seul transcrite viral exprimé (Usui et al. 2008; Saito et al. 2009; Macnamara et al. 2010).

## *C.2/ Régulation de l'expression des gènes cellulaires*

L'expansion clonale, ainsi que la pathogénèse associée à l'infection par HTLV-1, reposent sur la dérégulation des principales voies cellulaires par les protéines virales. Parmi elles, les protéines Tax et HBZ sont considérées comme étant les protéines majeures de l'oncogénèse virale. La dualité de fonction de Tax et HBZ pour le contrôle de l'expression viral a aussi pu être mis en évidence pour le contrôle de l'expression des gènes cellulaires (Matsuoka and Yasunaga 2013). Nous développerons ici le rôle de Tax dans le développement de la pathologie. Jusqu'ici, les études concernant Tax ce sont limitées à ces effets sur la régulation transcriptionnelle des gènes cellulaires (Curren et al. 2012).

### *a. Tax : un oncogène multi-fonctionnel*

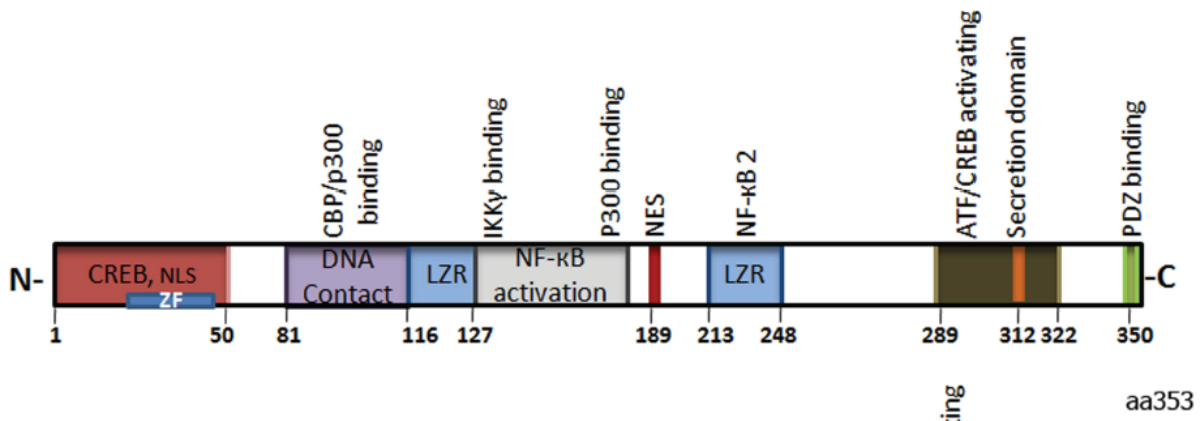
La protéine Tax du HTLV-1 est une protéine clé pour la viabilité du virus, mais également pour le développement des pathologies associées à l'infection par HTLV-1. Tax a été la première protéine du virus identifiée comme ayant un pouvoir oncogène. Au début des années 1990, des travaux *in vitro* ont montré que, en coopération avec Ras, Tax est capable de transformer des fibroblastes embryonnaires de rat (Pozzatti et al. 1990). Tax seule a par la suite été montrée capable d'induire la transformation de cellules Rat2 (Smith and Greene 1991). Tax est suffisante pour l'immortalisation de cellules T primaires humaines (Grassmann et al. 1992). *In vivo*, l'expression de Tax permet d'induire des tumeurs dans des souris transgéniques (Grossman et al. 1995; Hasegawa et al. 2006). De nouveaux résultats laissent penser que les effets de Tax ont été surévalués. En effet, il apparaît que la transformation de cellules lymphocytes primaires humaines par Tax est rare (Bellon et al. 2010). De plus, la protéine Tax serait moins efficace que son homologue Tax 2 du HTLV-2 pour la transformation de lymphocytes primaires, alors que le HTLV-2 n'est pas associé au développement de leucémie (Imai et al. 2013). Tax reste cependant une des protéines essentielle pour le virus. Au niveau moléculaire, Tax est impliquée dans la dérégulation de nombreuses



voies cellulaires, notamment celles contrôlant le cycle cellulaire ainsi que l'intégrité du génome. Elle agit principalement en interagissant directement avec les protéines régulatrices de ces voies cellulaires, ou bien en régulant l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans ces voies.

*i) Propriétés physicochimiques et domaines protéiques de Tax*

Tax est une protéine de 353 acides aminés, d'un poids moléculaire de 40 kDa. Elle est codée par l'ORF IV de la région pX du virus HTLV-1. Sa structure cristallographique n'a pu être réalisée, néanmoins, une carte détaillée de ses domaines fonctionnels, notamment au niveau transcriptionnel, a pu être réalisée (**FIGURE 8**).



**Figure 8. Représentation schématique des domaines fonctionnels de Tax.** D'après (Shirinian et al. 2013).

NLS : Nuclear localization signal. NES : Nuclear export signal. ZF : Zinc Finger motif. NLD : Nuclear localization domain. LZR : Leucine zipper region. LD : Localization domain.

En partant de son extrémité N terminale, Tax possède :

- Un domaine d'activation CREB (cyclic AMP responsive element binding) indispensable pour l'activation du promoteur viral
- Un domaine Zinc Finger (ZF), permettant l'association de Tax avec de nombreux facteurs de transcription
- Un domaine de signalisation nucléaire (NLS), adressant la protéine au noyau
- Un domaine de liaison avec CBP/p300, lui permettant ainsi d'être en contact avec l'ADN

- Deux domaines Leucine Zipper (LZR) permettant la dimérisation de la protéine et l'interaction avec l'ADN. Ils sont entre autre impliqués dans l'activation de la voie NF-kB non canonique
- Un signal d'export nucléaire (NES) permet à Tax de se localiser aussi au niveau du cytoplasme
- Un domaine d'activation CREB/ATF
- Et finalement un PDZ-binding motif en C terminal, permettant son interaction avec les protéines portant un motif PDZ

## ii) Localisation et modifications post-traductionnelles de Tax

### *α. Localisation cellulaire*

Tax a tout d'abord été montrée comme étant localisée au niveau du noyau. Lorsqu'elle est surexprimée, Tax se distribue de manière ponctuelle au niveau de structures appelées corps nucléaires (Tax nuclear bodies) (**FIGURE 9**) (Semmes and Jeang 1996). Ces corps nucléaires co-localisent en partie avec des structures riches appelées nuclear speckles. Ces structures sont riches en facteurs d'épissage, notamment SC35. Cependant, les tax nuclear bodies ne sont pas retrouvés *in vivo*.



**Figure 9. Co-localisation de Tax avec le facteur d'épissage SC35.** D'après (Semmes and Jeang 1996).

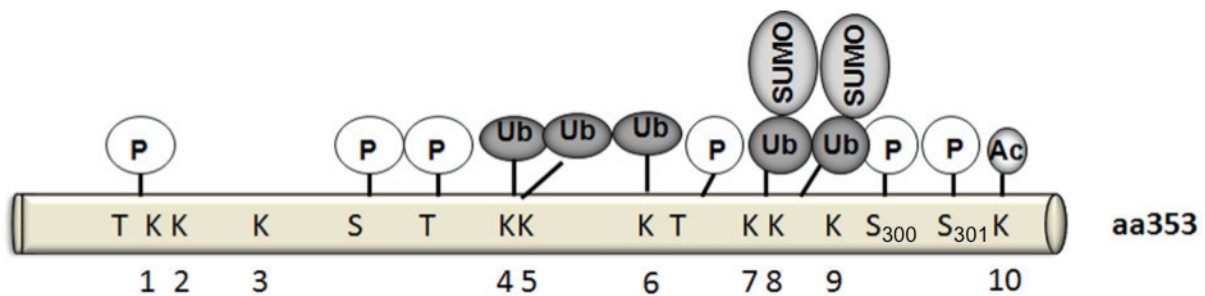
Analyse par microscopie confocale de la localisation de Tax dans des cellules HeLa transitoirement transfectées par un plasmide d'expression de Tax. Le signal vert correspond au marquage anti-SC35, le signal rouge au marquage anti-Tax. Le signal jaune correspond à la co-localisation des deux protéines.

De nombreuses études ont aussi montré une localisation cytoplasmique de Tax (Burton et al. 2000). Tax est détectée de manière diffuse dans le cytoplasme, mais aussi concentrée dans des domaines spécifiques, pour la majorité en périphérie du noyau (Alefantis et al. 2007). Tax a été montrée au niveau de l'appareil de Golgi, du centre organisateur des microtubules ainsi qu'au niveau de la synapse virologique (Nejmeddine et al. 2005).

Pour finir, Tax est aussi capable d'être excrétée. En effet, on peut détecter la protéine Tax dans le milieu extracellulaire, notamment dans le liquide céphalorachidien des patients infectés TSP/HAM (Alefantis et al. 2005).

### *β. Modifications post-traductionnelles de Tax*

Tax subit d'importantes modifications post-traductionnelles qui influencent sa localisation ainsi que son activité. Tax subie des modifications de types : phosphorylation, ubiquitinylation, SUMOylation et acétylation (**FIGURE 10**) (Bex et al. 1999; Nasr et al. 2006; Lodewick et al. 2009).



**Figure 10. Modifications post-traductionnelles de Tax.** Adaptée d'après (Shirinian et al. 2013).

T : thréonine. K : lysine. S : sérine. P : phosphorylation. Ub : ubiquitinylation. SUMO :SUMOylation. Ac : acétylation.

Tax peut être phosphorylée sur 6 résidus (**FIGURE 10**). Les sérines en positions 300 et 301 sont les cibles majeures de phosphorylation. La phosphorylation d'une de ces sérines au moins est indispensable pour la localisation de Tax dans les corps nucléaires et l'activation des voies CREB/ATF et NF-kB (Bex et al. 1999).

Il a aussi été montré que la phosphorylation des sérines 300 et 301 est indispensable pour d'autres modifications post-traductionnelles, et notamment l'acétylation de la lysine en position 346 (K10) (**FIGURE 10**). L'acétylation de Tax est réalisée par p300, vraisemblablement au niveau corps nucléaires. Celle-ci jouerait un rôle dans l'activation de la voie NF-kB (Lodewick et al. 2009; Lodewick et al. 2011).

Les rôles de l'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax dans la localisation de la protéine ainsi que l'activation de la voie NF-kB restent controversés. 5 sur les 10 lysines que possède Tax sont définies comme des cibles majeures de l'ubiquitinylation (**FIGURE 10**). La SUMOylation quant à elle cible les lysines en position 280 (K7) et 284 (K8) (Lamsoul et al. 2005; Nasr et al. 2006). Une étude récente sur des lignées cellulaires ainsi que des lymphocytes T CD4+ primaires, a permis de confirmer le rôle de la SUMOylation de Tax pour la formation des Tax bodies au niveau du noyau. Par contre, il semblerait que l'activation de la voie NF-kB serait uniquement dépendante du niveau d'ubiquitinylation de Tax, et non pas de SUMOylation (Bonnet et al. 2012).

#### b. Effets de Tax sur les voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire et l'intégrité du génome

Comme introduit précédemment, outre ses effets sur l'expression du virus, Tax est également capable d'induire l'immortalisation et la transformation cellulaire, notamment en influençant directement (physiquement) ou indirectement la régulation des mécanismes cellulaires contrôlant la prolifération, la survie cellulaire et l'intégrité du génome.

##### *i) TAX et les points de contrôle du cycle cellulaire :*

Le cycle cellulaire est finement régulé *via* de nombreux points de contrôles. Cette régulation s'effectue par 3 grandes familles protéiques : les protéine kinase cycline dépendante (CDK), les cyclines et les protéines inhibitrices des cyclines (CKI). La protéine Tax est capable d'accélérer le cycle cellulaire en interagissant avec un grand nombre de ces protéines (**FIGURE 11**).

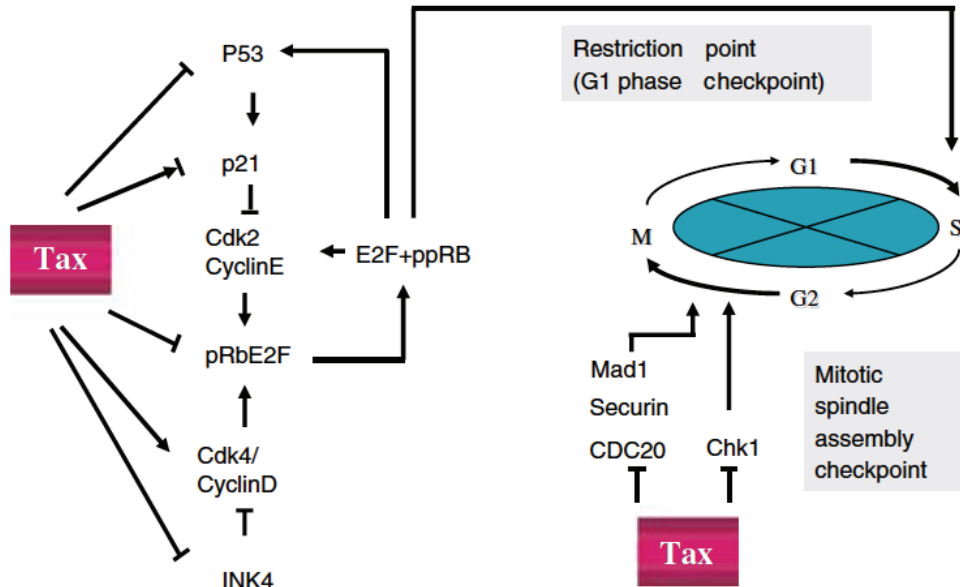


Figure 11. Effets de Tax sur l'accélération du cycle cellulaire. D'après (Grassmann et al. 2005).

Tax accélère la phase G1/S en réprimant l'expression de INK4 et en augmentant l'expression de Cdk4/CyclinD et Cdk2/CyclinE. Tax facilite l'entrée en phase S par la libération de E2F1, ainsi que l'inhibition des points de contrôle par l'inactivation de p53. Finalement, Tax inhibe aussi les points de contrôle de la phase G2/M.

Tax accélère le passage de la phase G1/S, notamment *via* l'augmentation de l'expression des cyclines D et E, des CDK 2 et 4, mais aussi en réprimant l'expression de certaines CKI (INK4 par exemple). De plus, Tax induit de manière directe et indirecte la dégradation de Rb par le protéasome, permettant la libération du facteur de transcription E2F1, indispensable à la transcription des gènes d'entrée en phase S (Haller et al. 2002; Fraedrich et al. 2005; Kehn et al. 2005; Yang et al. 2011).

L'entrée en phase S est aussi facilitée par l'action négative de Tax sur p53. Tax est capable d'inhiber le point de contrôle en inactivant p53 (Tabakin-Fix et al. 2006). Tax stabilise la forme phosphorylée de p53 *via* l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, ce qui inhibe son activité transcriptionnelle (Pise-Masison et al. 1998a; Pise-Masison et al. 1998b). Par ailleurs, il a été montré que l'inhibition de p53 par Tax pouvait être dépendante de la voie CREB/ATF (Mulloy et al. 1998).

Au cours des phases G2/M, Tax est capable d'inhiber les voies de signalisation de ATM/ATR indispensable à la réparation de l'ADN et à l'arrêt du cycle. Tax redistribue la protéine TP53BP1, indispensable à la reconnaissance des dommages à l'ADN et à la

signalisation de la voie ATM/chk2. Tax se lie aussi à chk1 et inhibe son activité kinase essentielle au point de contrôle S/G2 (Haoudi and Semmes 2003; Park et al. 2004).

Enfin, au cours de la mitose, Tax interfère avec le processus de ségrégation des chromosomes en interagissant physiquement avec la protéine hsMAD1 (Mitotic Arrest Defective). Cette interaction aboutit à un défaut de fixation des centromères au fuseau mitotique et favoriserait l'aneuploïdie (Jin et al. 1998).

Ces données permettent d'expliquer les réarrangements chromosomiques observés *in vivo* dans les cellules T CD4+ infectées ainsi que l'aneuploïdie récurrente des cellules d'ATLL (Kamihira et al. 1994).

#### *ii) Tax et l'apoptose*

Les effets de Tax sur le cycle cellulaire et l'intégrité du génome sont susceptibles de déclencher une réponse au stress et l'apoptose des cellules. Cependant, l'inhibition de p53 par Tax contribue à protéger les cellules de la mort cellulaire (Saggiaro et al. 2009) **(FIGURE 12)**. Tax intervient également dans la voie extrinsèque de l'apoptose en induisant la surexpression des facteurs anti-apoptotiques c-FLIP (Krueger et al. 2006), bcl-xl, c-IAP et survivine (Kawakami et al. 1999; Tsukahara et al. 1999; Kawakami et al. 2005), notamment *via* l'activation de la voie NF-kB. A noter, il a été démontré que Tax était capable d'induire une hyper-activation de NF-kB et une sénescence subséquente (Zhi et al. 2011; Ho et al. 2012). HBZ, en interagissant avec RelA (p65) et en augmentant l'expression de l'ubiquitine ligase E3 PDLIM2, induit une diminution de la liaison de RelA à l'ADN ainsi que sa dégradation par le protéasome (Zhao et al. 2009). Ainsi HBZ permet de lever les effets cytotoxiques de Tax. Des travaux montrent que l'expression de Tax peut s'accompagner d'une surexpression de protéines pro-apoptotiques comme Puma et NOXA ou encore les ligands des récepteurs de mort TRAIL et FasL (Chen et al. 1997; Mihaylova et al. 2008). Les niveaux d'expression de Tax dans les essais *in vitro* pourraient expliquer la divergence de ces résultats. A forte dose, Tax induit l'apoptose des cellules, alors qu'à faible dose elle stimule la mise en cycle des cellules (Chlichlia and Khazaie 2010).

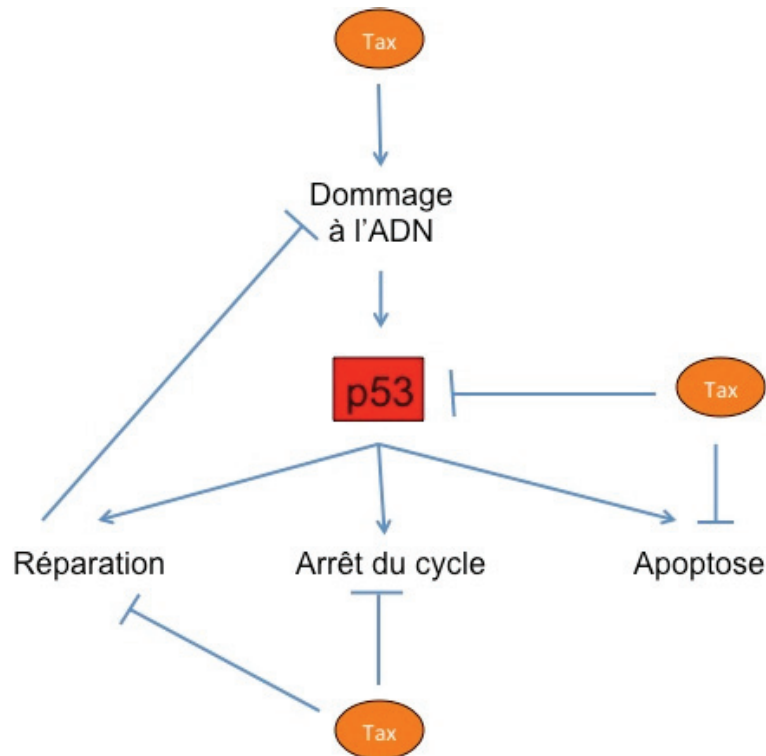


Figure 12. Inhibition de p53 par tax et ces conséquences sur la cellule hôte.

En inhibant p53, Tax peut inhiber la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose des cellules. Les cellules exprimant Tax peuvent donc continuer de proliférer sans contrôles.

### iii) Tax et l'intégrité du génome

L'instabilité génétique est un des facteurs clé de la tumorigenèse en favorisant les réarrangements géniques et en conséquence l'expression de transcrits et/ou de protéines aux fonctions parfois modifiées voire oncogènes. De nombreuses études décrivent les effets mutagènes de Tax *via* notamment ses interactions avec les voies de réparation de l'ADN, les centrosomes et le système télomères/téломérase.

#### *α. Voies de réparation de l'ADN*

Tax est capable d'interférer avec toutes les voies de réparation de l'ADN, ayant pour conséquences l'introduction de mutations dans le génome des cellules infectées **(FIGURE 13)**. En inhibant l'action de p53, Tax inhibe l'activation de la réparation par excision de nucléotide (NER) **(FIGURE 13)**. De plus, une corrélation entre la surexpression de PCNA (Proliferating cell Nuclear Antigen) par Tax et l'inhibition du

NER a été mis en évidence (**FIGURE 13**) (Lemoine et al. 2000). En inhibant la polymérase bêta ( $\text{pol}\beta$ ), Tax inhibe aussi les voies de réparations par excision de base (BER) et des mésappariements (MMR) (**FIGURE 13**) (Jeang et al. 1990). Tax inhibe aussi les voies de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) et non-homologue (NHEJ) en séquestrant des protéines impliquées dans ces voies de réparation telles que BRCA1 et MDC-1, mais aussi en inhibant l'expression de Ku80, la sous unité régulatrice des protéines de la famille DNA-PK (DNA dependent Protein Kinase) (**FIGURE 13**) (Durkin et al. 2008; Ducu et al. 2011).

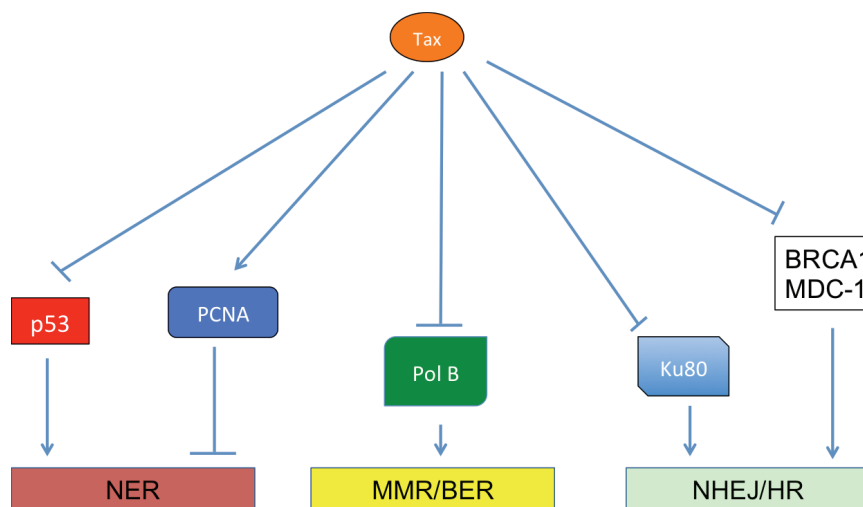


Figure 13. Inhibition des voies de réparation de l'ADN par Tax.

Tax inhibe les voies de réparation de l'ADN, notamment en inhibant p53, Pol B, Ku80, BRCA1 et MDC-1, ainsi qu'en activant PCNA. NER : réparation par excision de nucléotide. MMR/BER : réparations par excision de base et des mésappariements. NHEJ/HR : réparation par recombinaison homologue et non homologue.

### *β. Le centrosome*

Le centrosome est le centre d'organisation de microtubules dans les cellules en interphase. Les anomalies de duplication du centrosome en phase S aboutissent à des aneuploïdies dans de nombreux cancers. Environ 30% des cellules d'ATL présentent des duplications centrosomiques. Il a été montré que Tax était capable d'induire la présence de centrosomes surnuméraires. Au niveau moléculaire, Tax interagit avec TAX1BP2, une protéine impliquée dans l'homéostasie du centrosome. La perte de l'interaction entre ces deux protéines abroge l'effet de Tax sur la formation de centrosomes surnuméraires. De même, l'inhibition de TAX1BP2 induit la présence de centrosomes surnuméraires.



Via son interaction avec TAX1BP2, Tax doit inhiber sa fonction et induire une mauvaise duplication du centrosome (Ching et al. 2006).

#### *δ. Le système télomère/téломérase*

Les télomères sont des séquences répétées de type (TTAGGG)<sub>n</sub>, situées à l'extrémité des chromosomes. Lors des divisions cellulaires, le génome ne se réplique pas jusqu'aux extrémités des chromosomes, par conséquent les télomères vont réduire de longueur. Les télomères peuvent se répliquer indépendamment de la machinerie de réplication cellulaire *via* la télomérase. L'activité de cette dernière est régulée principalement par sa sous-unité catalytique *hTERT*. Au niveau des cellules somatiques, l'expression d'*hTERT* est quasi-nulle, les télomères raccourcissent donc à chaque division. Comme dans de nombreux cancers, les cellules d'ATL présentent une surexpression d'*hTERT*, et l'agressivité de l'ATL est corrélée à son expression. A l'opposé, au stade pré-leucémique de l'infection par HTLV-1, notre laboratoire a montré que Tax réprime l'expression d'*hTERT*, induisant une inhibition de la télomérase, ce qui a pour conséquence une instabilité génétique, notamment *via* des réarrangements chromosomiques (Uchida et al. 1999; Gabet et al. 2003). A l'inverse, il a été montré par une autre équipe que Tax activait l'expression d'*hTERT* (Sinha-Datta et al. 2004). Finalement, une troisième équipe a élucidé le rôle de Tax sur l'expression d'*hTERT*. L'effet de Tax sur *hTERT* semblerait dépendant de l'état d'activation de la cellule. Dans les cellules activées, Tax inhiberait l'expression d'*hTERT*, alors qu'elle l'activerait dans les cellules quiescentes (Hara et al. 2008).

#### *c. Dérégulation de l'expression des gènes par Tax*

Les effets de Tax au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes cellulaires ont été largement décrits. La majorité des travaux s'est intéressée aux effets de Tax sur la régulation de l'activité des promoteurs cellulaires. Peu de données sont aujourd'hui disponibles sur les effets de Tax au niveau post-transcriptionnel.

### *i) Tax et les facteurs de transcription*

Tax régule l'activité des promoteurs cellulaires en détournant les facteurs de transcription.

#### *α. CREB/ATF*

Comme décrit dans le paragraphe «*Tax, un transactivateur transcriptionnel des gènes viraux*» (**page 22**), Tax est capable de recruter les facteurs de transcription CREB/ATF au niveau du promoteur viral. Il peut de la même manière réguler l'expression de gènes cellulaires *via* ces facteurs de transcription au niveau de leur site CRE. Par exemple, Tax active l'expression de l'IL-17 et de c-fos, et réprime l'expression de la cyclin A, de p53 et de c-myc de manière CREB/ATF dépendante (Alexandre and Verrier 1991; Mulloy et al. 1998; Nicot et al. 2000b; Kibler and Jeang 2001; Dodon et al. 2004).

#### *β. NF-κB*

Les facteurs de transcription de la voie NF-κB jouent un rôle crucial dans la prolifération, l'apoptose, l'oncogenèse et la réponse immunitaire. Au niveau des cellules au repos, les dimères RelA/p50 et RelB/p100 sont séquestrés dans le cytoplasme par les inhibiteurs p105, p100, IκBα, IκBβ et IκBγ (**FIGURE 14**). L'activation de la voie NF-κB requière la phosphorylation des inhibiteurs de la voie par les IKK, qui vont entraîner leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome. L'activation de la voie NF-κB résulte d'une grande variété de signaux extracellulaires ou cellulaires qui peuvent emprunter deux voies distinctes : la voie canonique et la voie non canonique. L'activation de la voie canonique induit l'activation du complexe IKK (IKKα et/ou IKKβ), qui phosphoryle les inhibiteurs IκBs, ce qui induira *in fine* leur dégradation par le protéasome, et donc la libération du dimère effecteur RelA (p65)/p50 (**FIGURE 14**). En ce qui concerne la voie non canonique, c'est la protéine NF-κB-inducing kinase (NIK) qui active par phosphorylation le dimère IKKα, qui va phosphoryler à son tour le précurseur p100 qui donnera alors p52. Le dimère RelB/p52 est l'effecteur de la voie non canonique (**FIGURE 14**).

Tax est capable d'activer la voie canonique et non canonique. Dans la première, Tax s'associe avec la sous-unité NEMO de  $IKK\gamma$ , forçant ainsi l'activation de  $IKK\alpha/IKK\beta$ . Le complexe IKK va ensuite phosphoryler et entraîner l'ubiquitinylation et la dégradation des inhibiteurs I $\kappa$ Bs, permettant la translocation du dimère RelA/p50 dans le noyau (**FIGURE 15 Gauche**) (Harhaj and Sun 1999). En ce qui concerne la voie non canonique, Tax induit le processing de p100 *via* son interaction avec NEMO. Tax peut aussi stimuler directement le clivage de p100. Le processing de p100 abouti à la production de p52, s'en suit la translocation de RelB/p52 dans le noyau (**FIGURE 15 Droit**) (Xiao et al. 2001).

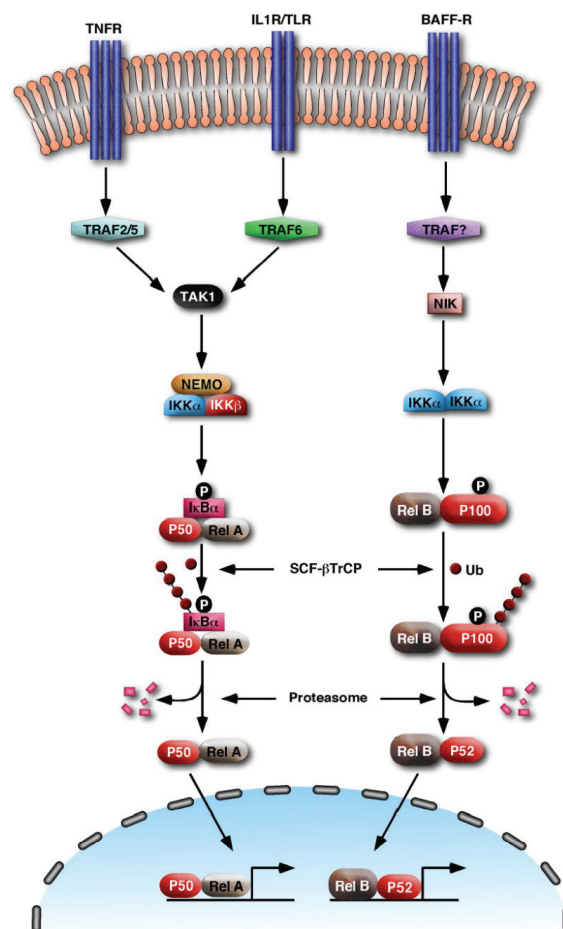


Figure 14. Activation de la voie NF- $\kappa$ B. D'après (Chen 2005).

Activation de la voie NF- $\kappa$ B canonique (à gauche) et non canonique (à droite). L'activation de la voie canonique induit l'activation du complexe  $IKK\alpha/IKK\beta$  par TAK1, qui phosphoryle l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  et induit sa dégradation par le protéasome, induisant la libération et la translocation dans le noyau de l'effecteur RelA/p50. En ce qui concerne la voie non canonique, c'est la protéine NIK qui active par phosphorylation le dimère  $IKK\alpha$ , qui va phosphoryler à son tour le précurseur p100 qui donnera alors p52, induisant la libération et la translocation du dimère RelB/p52 dans le noyau.

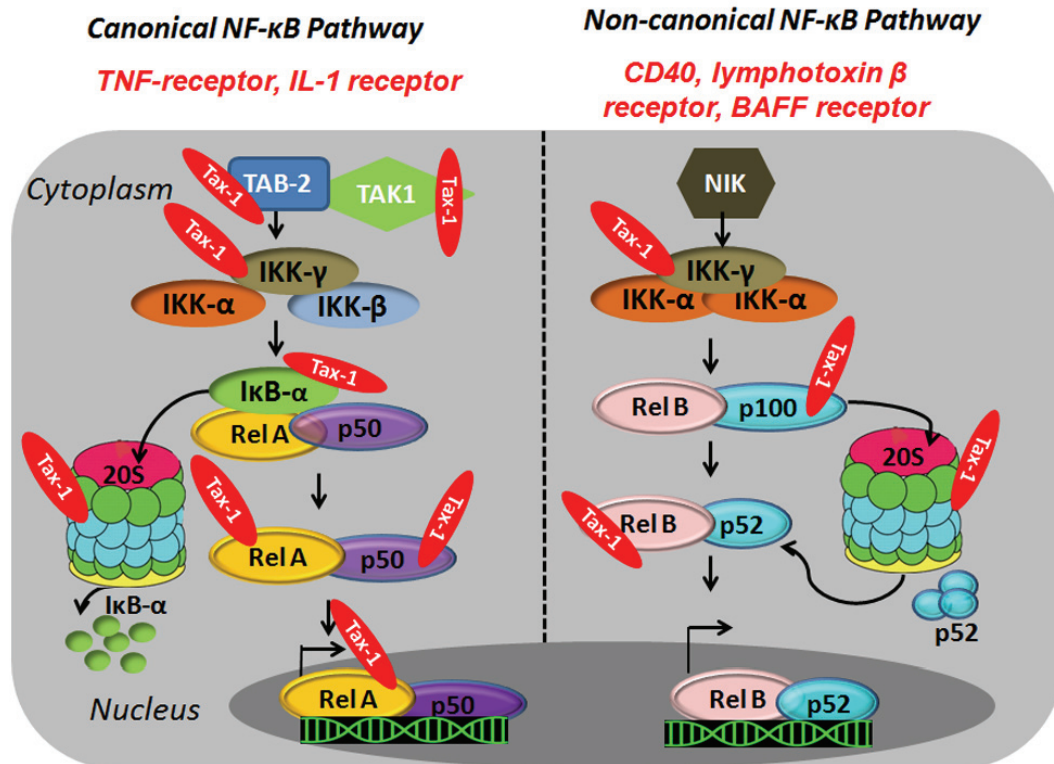


Figure 15. Activation des voies canonique et non canonique de NF-κB par Tax. D'après (Shirinian et al. 2013).

Tax active la voie canonique NF-κB en s'associant avec la sous-unité NEMO de IKK $\gamma$  ou bien des kinase en amont, forçant ainsi l'activation de IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . Tax est retrouvée dans le noyau avec RelA/p50 au niveau des promoteurs de gènes cibles. En ce qui concerne la voie non canonique, Tax induit le processing de p100 *via* son interaction avec NEMO. Tax peut aussi stimuler directement le clivage de p100 en p52.

#### *δ. Facteur de réponse au sérum (SRF)*

Au niveau des cellules infectées par HTLV-1, on observe une forte expression des facteurs AP-1 (activator protein 1), qui consistent en des homo- ou hétéro-dimères des protéines de la famille Fos et Jun. c-fos est régulée transcriptionnellement par le facteur SRF, *via* une la liaison de ce dernier sur la séquence promotrice de c-fos, au niveau du site de réponse au sérum (SRE). Il a été montré que Tax interagit avec le facteur SRF, augmentant la liaison de SRF au niveau du site SRE sur le gène c-fos (Fujii et al. 1991; Winter and Marriott 2007). Une fois le complexe mis en place, Tax recrute alors CBP/p300 et P/CAF, ce qui a pour conséquence l'activation de la transcription de c-fos.

## *ii) Régulation des enzymes modificatrices de la chromatine*

La protéine Tax interagit avec de nombreuses protéines agissant sur l'état de condensation de la chromatine, modulant ainsi l'accès à la chromatine et donc la régulation de la transcription des gènes. Beaucoup d'études concernant les effets de Tax sur la chromatine ont été réalisées au niveau du promoteur viral, néanmoins, les mêmes mécanismes pourraient être envisagés au niveau des promoteurs cellulaires.

### *α. Histone acétyltransférase (HAT) et Histone déacétylase (HDAC)*

Tax interagit avec l'HDAC-1 (histone deacetylase 1), ce qui va entraîner son départ du promoteur viral, permettant ensuite le recrutement des activateurs de la transcription (**FIGURE 16A**). A l'inverse, au niveau du gène SHP-1 (SH(2)-homology-containing protein-tyrosine phosphatase-1), il a été montré par immunoprécipitation de la chromatine, que Tax était capable d'inhiber l'expression du gène *via* le recrutement de HDAC-1 au profit des facteurs de la voie NF-κB (Lu et al. 2004; Cheng et al. 2007).

L'acétylation des lysines en position N terminal des histones par les HATs (histone acetyltransférase) est une étape cruciale dans l'activation de la transcription des gènes. Tax interagit avec plusieurs HATs telles que p300, CBP et P/CAF au niveau des promoteurs des gènes ciblés par Tax. Tax recrute ces HATs une fois qu'un complexe ADN/facteur de transcription/Tax soit formé sur le promoteur du gène cible pour activer sa transcription (**FIGURE 16B**) (Riou et al. 2000; Geiger et al. 2008).

### *β. Histone méthyltransférase (HMT) et Histone déméthylase (HDM)*

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) joue un rôle important pour la structure de la chromatine. Tax interagit avec l'HMT (histone methyltransférase) SUV39H1 ainsi que l'HDM (histone demethylase) JMJD2A (Gray et al. 2005; Kamoï et al. 2006). La méthylation du H3K9 est un marqueur de répression de la transcription. En interagissant avec ces HMT et HDM, Tax peut réguler l'état de méthylation de la chromatine au niveau des promoteurs viraux et cellulaires, et donc par conséquence leur activité transcriptionnelle (**FIGURE 16A**).

#### δ. Le complexe Switch/Sucrose Non Fermentable (SWI/SNF)

Le complexe SWI/SNF utilise l'énergie de l'ATP pour remodeler la structure chromatinienne, permettant ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN mais aussi la progression de la fourche transcriptionnelle lors de l'élongation de la transcription. Tax interagit avec plusieurs facteurs du complexe SWI/SNF tels que BRG1. Au niveau du promoteur viral, *via* son interaction avec SWI/SNF, Tax permet le recrutement subséquent des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II (**FIGURE 16C**), mais aussi prévient la pause de l'ARN polymérase II lors de la transcription (**FIGURE 16D**). Tax pourrait aussi jouer indirectement sur la fonction de SWI/SNF en interagissant avec l'ADN topoisomérase I (Suzuki et al. 2000; Lemasson et al. 2006).

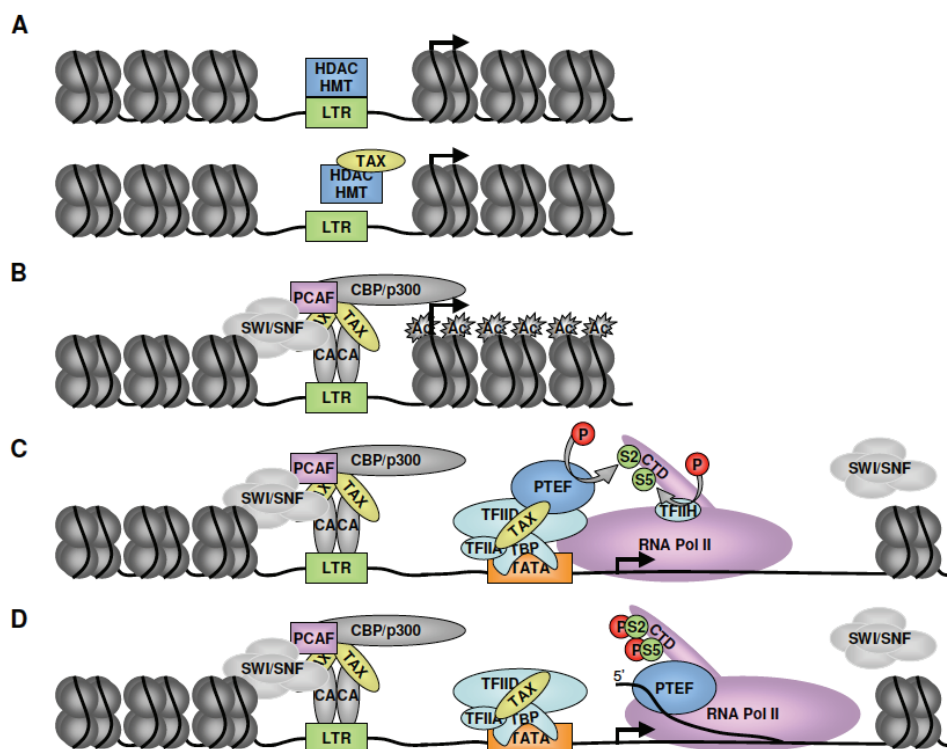


Figure 16. Modèle de transactivation du promoteur viral par Tax. D'après (Boxus et al. 2008).

Tax lève l'inhibition de la transcription du provirus en interagissant avec les HDAC et HMT (panel A). Tax recrute le facteur de transcription CREB/ATF ainsi que les facteurs de remodelage de la chromatine SWI/SNF, et de modifications post-traductionnelles des histones PCAF, CBP/p300 (panel B). Tax induit le recrutement des facteurs basales de la transcription au niveau de la boîte TATA (panel C). Finalement, Tax recrute P-TEFb, induisant la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II et la progression de l'élongation de la transcription (panel D).

### *iii) Régulation de l'ARN polymérase II*

Le facteur général de la transcription TFIIA interagit avec la sous unité TBP (TATA-binding protein) de TFIID, afin d'aider sa liaison au niveau de la boîte TATA présente sur les promoteurs. La formation de ce complexe permet la reconnaissance des promoteurs ainsi que la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Tax, interagit avec les facteurs de transcription basal TFIIA et TBP, renforce leur liaison à l'ADN et stimule ainsi l'initiation de la transcription (**FIGURE 16C**) (Caron et al. 1993; Clemens et al. 1996; Caron et al. 1997).

Le recrutement de l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription au niveau du promoteur d'un gène n'est pas suffisant pour activer sa transcription. La transition entre l'étape d'initiation de la transcription et de l'élongation, requière des modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II, et notamment la phosphorylation de ses sérines en position 2 (S2) par le la CDK9 du complexe P-TEFb (Positive transcription elongation factor b). Comme vu précédemment au paragraphe «*Tax, un transactivateur transcriptionnel des gènes viraux*» (**page 22**), Tax recrute P-TEFb au niveau du promoteur viral, active la CDK9 qui va ensuite phosphoryler la S2 sur le CTD de l'ARN polymérase II. La phosphorylation spécifique de la S2 du CTD induit l'élongation de la transcription (**FIGURE 16C**) (Zhou et al. 2006; Cho et al. 2007; Cho et al. 2010).

## **2/ Epissage Alternatif, HTLV-1 et Tax**

### **A/ Epissage alternatif**

L'épissage alternatif est le mécanisme qui permet, à partir d'un seul ARN pré-messager (pre-mRNA) issu d'un gène unique, d'obtenir des transcrits de structure différentes capables (ou non) de produire des protéines de structures diverses aux propriétés fonctionnelles modifiées, voire parfois opposées. L'épissage alternatif affecte environ 95% des gènes humains et en conséquence joue un rôle essentiel dans la diversité du transcriptome, du protéome, et le phénotype cellulaire. Au plan moléculaire, bien que décrit à l'origine comme un mécanisme post-transcriptionnel indépendant, il est



aujourd'hui établit que les processus d'épissage alternatif sont étroitement couplés à la transcription.

### A.1/ Présentation

C'est à la fin des années 1970 que des chercheurs travaillant sur l'Adenovirus 2, en comparant les séquences des ARN messagers avec les séquences génomiques, ont montré que des régions de l'ARN pré-messager étaient excisées et que les séquences restantes étaient jointes ensemble et exportées vers le cytoplasme (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). Ce phénomène a par la suite été montré chez les mammifères pour les ARN de la globine (Jeffreys and Flavell 1977), l'ovalbumine (Breathnach et al. 1977) et l'immunoglobuline (Tonegawa et al. 1978).

#### a. Epissage constitutif

La plupart des gènes transcrits par l'ARN polymérase II sont composés de 2 types de séquences qui s'alternent : les exons et les introns (**FIGURE 17**). Les premières études sur des gènes modèles, comme l'ovalbumine, ont révélé qu'il existait des sites consensus permettant de définir la limite intron/exon (Breathnach et al. 1978). De façon intéressante, ces séquences consensus étaient conservées chez les vertébrés, les plantes et les levures (Padgett et al. 1986). Le mécanisme général d'excision des introns et de raboutage des exons est appelé épissage.

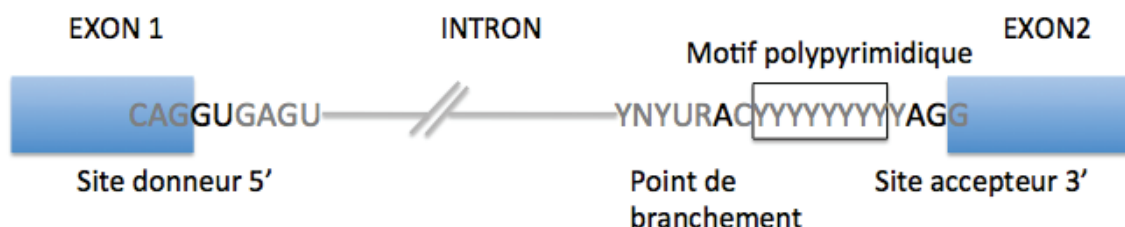


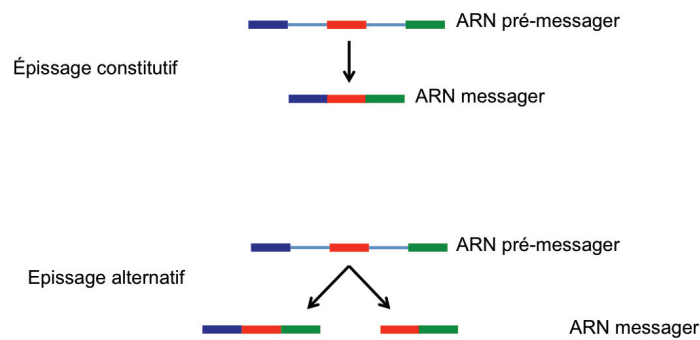
Figure 17. Structure d'un ARN pré-messager.

Au niveau de l'intron, plusieurs motifs permettent la réaction d'épissage. La partie 5' de l'intron est caractérisée par le site donneur d'épissage (GU), le site accepteur d'épissage en 3' (AG), le point de branchement (A) ainsi qu'un motif polypyrimidique (YYYYYYY).



## b. Épissage alternatif

Certains exons ne sont pas toujours constitutivement inclus dans l'ARN messenger. En fonction du contexte cellulaire, un ARN pré-messager pourra être épissé de manière alternative, donnant ainsi plusieurs ARN messagers différents ; on parle alors d'épissage alternatif (**FIGURE 18**). Pour exemple, il a été démontré chez la *Drosophile* que le gène *Dscam* pouvait coder jusqu'à 36 000 variants d'épissage différents (Celotto and Graveley 2001). Les nouvelles méthodes d'analyse du transcriptome à haut débit, telles que les puces exons spécifiques ou le séquençage à haut débit des ARN, ont mis en évidence que la quasi-totalité des ARN cellulaires pouvait être épissée de manière alternative (Pan et al. 2008). Il a aussi été montré que l'expression des exons (exome) est spécifique de la nature du tissu (Wang et al. 2008).



**Figure 18. Épissage alternatif vs épissage constitutif.**

Dans le cas de l'ARN pré-messager du haut, l'exon en rouge est dit constitutif car il est toujours inclus dans l'ARN messenger. On parle alors d'épissage constitutif. Dans le cas du bas, l'exon en rouge est dit alternatif, il peut être inclus ou non dans l'ARN messenger lors de la réaction d'épissage. On parle dans ce cas d'épissage alternatif.

## c. Rôles de l'épissage alternatif

### i) Modifications qualitatives des ARNm

Le génome humain porte approximativement 25000 gènes codant des protéines. La majorité de ces gènes produisent plusieurs isoformes d'ARN messenger *via* l'épissage alternatif de leur pre-mRNA (Pan et al. 2008; Wang et al. 2008). L'épissage alternatif est donc une source importante de diversité du protéome chez les organismes eucaryotes supérieurs (Maniatis and Tasic 2002; Johnson et al. 2003). Il existe des différences

d'épissage alternatif entre individus d'une même espèce. L'analyse de l'expression de 70 exons alternatifs entre 22 individus, a révélé que 6 exons présentaient des différences significatives d'expression entre individus (Hull et al. 2007). Ces différences d'épissage ont pu être associées à la présence de polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) au niveau de l'ADN (Hull et al. 2007; Douglas et al. 2009; Iwata et al. 2009).

La modification de l'épissage alternatif a potentiellement pour conséquence une modification des interactions protéiques s'il y a perte ou ajout de domaine d'interaction sur la protéine finale. La localisation de la protéine peut être aussi altérée *via* l'épissage alternatif si ce dernier impacte les signaux de localisation cellulaire, les signaux de modifications post-traductionnelles, ou modifie les séquences d'interactions protéiques. Les modifications d'épissage alternatif sont aussi connues pour réguler l'activité des facteurs de transcription et des enzymes, en impactant les domaines trans-activateurs ou bien de liaison à l'ADN (pour revue : (Kelemen et al. 2013)).

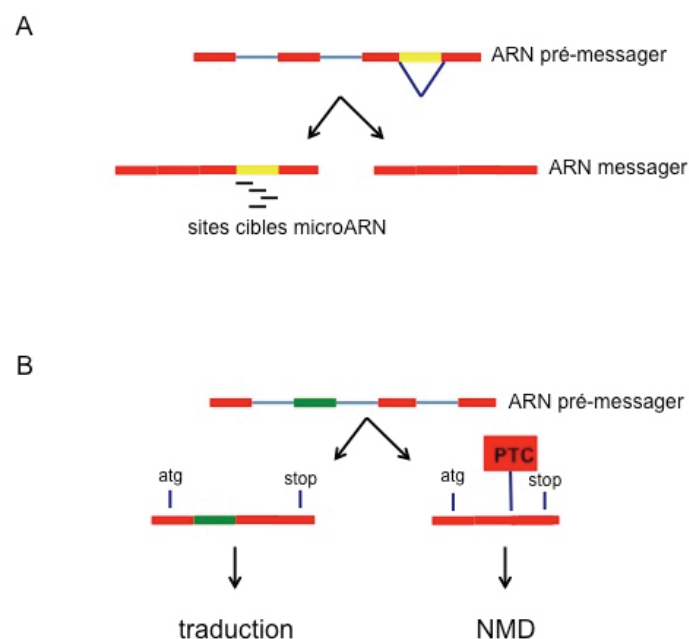
Il a aussi été montré que l'épissage alternatif pouvait avoir des conséquences plus drastiques. En effet, l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager peut avoir pour conséquence la production de protéines ayant des rôles antagonistes. Par exemple, l'activité de nombreuses protéines impliquées dans les voies de mort cellulaire est régulée par l'épissage alternatif. Le gène *bcl-x* en est un bon exemple. Son épissage aboutit à la formation de 2 isoformes codant 2 protéines : la forme *bcl-xl*, qui est un anti-apoptotique, et la forme *bcl-xs*, qui est pro-apoptotique (Xerri et al. 1998).

#### *ii) Modification quantitative des ARNm*

Outre son rôle sur les modifications structurales des protéines, l'épissage alternatif permet également de réguler le niveau d'expression des gènes cellulaires en générant des transcrits pris en charge par le système de dégradation des ARN non-sens (NMD : Nonsense Mediated mRNA Decay) ou en échappant à la sélection des mirco-ARN.

*α. Couplage entre épissage alternatif et la dégradation des ARN non-sens*

Les analyses à haut débit (RNA-seq) ont montré que 20 à 35% des évènements d'épissage alternatif induisent l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC) dans le cadre de lecture de l'ARNm (**FIGURE 19B**) (Green et al. 2003; Lewis et al. 2003; Baek and Green 2005). Ces ARNm portant un PTC sont ciblés par un mécanisme de contrôle qualité de l'ARN appelé NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay). Le NMD permet la dégradation de l'ARNm portant un PTC, prévenant ainsi l'apparition de protéines tronquées, pouvant être délétères pour la cellule (Huang and Wilkinson 2012). Ainsi, l'épissage alternatif, en favorisant l'apparition de PTC peut spécifiquement conduire l'ARN vers la dégradation par le NMD. Il a récemment été découvert que le NMD pouvant aussi potentiellement réguler 10% des gènes cellulaires eucaryotes, en régulant la stabilité de leur ARNm, indépendamment de la présence d'un PTC sur ce dernier (Huang and Wilkinson 2012). L'épissage alternatif et le NMD sont donc 2 mécanismes complémentaires, qui permettent la régulation quantitative des ARNm cellulaires.



**Figure 19. Epissage alternatif et régulation quantitative des ARN messager.**

(A) L'épissage alternatif peut conduire à la production d'isoforme d'ARN ne possédant plus les séquences des sites de liaison des micro-ARN (partie en jaune), stabilisant ainsi le transcrit. (B) La perte de l'exon en verte lors de l'épissage alternatif du pré-messager a pour conséquence l'introduction d'un codon stop prématuré (PTC) dans l'ARN finale, entraînant ainsi le ciblage de cet ARN par le NMD.

### *β. Polyadénylation alternative et microARN*

La partie 3' de l'ARN pré-messager subit un clivage suivi de l'addition d'une queue polyadénylée. Par l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage à haut débit, il a pu être mis en évidence qu'environ 70% des gènes humains utilisent des sites alternatifs de polyadénylation (polyA) (Shi 2012). Ce choix de site de polyA peut générer des ARNm de taille différente au niveau de leur partie 3' codante ou 3' non traduite (3' UTR).

La stabilité des ARNs messagers peut être régulée *via* l'interaction de petits ARN non codants, les micro-ARNs (miRNAs), au niveau de leurs séquences cibles situées généralement dans la partie 3' UTR des ARNm. En modifiant la longueur de la partie 3' UTR de l'ARNm, le choix de polyA alternatif peut ainsi contrôler le nombre de sites cibles de miRNAs présent sur l'ARNm (**FIGURE 19A**). De manière intéressante, il a été montré que le choix de polyA est fortement régulé lors de la mise en cycle des cellules T, induisant souvent un raccourcissement des 3' UTR dans les cellules en prolifération par rapport à leur contrepartie quiescentes (Sandberg et al. 2008). Une étude sur 27 lignées cellulaires cancéreuses, a mis en évidence un raccourcissement des 3'UTR au niveau des lignées cancéreuses par rapport aux contrôles. Ce raccourcissement du 3'UTR a pu être relié à une perte de ciblage par les miRNAs, induisant une augmentation jusqu'à 10 fois des quantités protéiques, ainsi que la production de proto-oncogène tel que l'isoforme courte de IMP-1 (Mayr and Bartel 2009).

Il a été montré que les mécanismes d'épissage alternatif et de clivage et polyadénylation étaient étroitement liés. Au niveau du 3' UTR de l'ARN, il a été mis en évidence *in vitro*, l'interaction du facteur d'épissage U2AF65 avec le facteur de clivage CFIm ; ou bien encore que PTB (Polypyrimidine tract-binding protein) recrutait le facteur d'épissage hnRNP H (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H). L'interaction entre ces protéines stimule le clivage et la polyadénylation de l'ARN *in vitro* (Millevoi et al. 2006; Millevoi et al. 2009). De plus, une étude à l'échelle du génome a révélé qu'au moins 20% des gènes humains présentent des sites de polyadénylation au niveau des introns des gènes. Ils ont pu mettre en évidence une corrélation négative entre l'utilisation des sites de polyA introniques et la force du site d'épissage en 5', et une corrélation négative entre l'utilisation des sites de polyA introniques et la longueur de l'intron (Tian et al. 2007).

Pour finir, deux études provenant du même laboratoire ont pu récemment mettre en évidence que U1 snRNP, un des composant majeur de la machinerie d'épissage, est impliqué dans la régulation du choix de site de clivage et polyadénylation (Kaida et al. 2010; Berg et al. 2012).

## A.2/ Mécanismes

### a. Le spliceosome

L'épissage des ARN pré-messagers est catalysé par un complexe ribonucléoprotéique de 4-5 Mda, appelé spliceosome. La majorité des ARN pré-messagers sont épissés *via* le spliceosome U2-dépendant, qui est le spliceosome majeur chez les eucaryotes. Les snRNP (small nuclear ribonucleo protein) sont les constituants majeurs du spliceosome. Il en existe 5 au niveau du spliceosome U2-dépendant (U1, U2, U4/U6, U5 snRNP). Ils consistent en une petite molécule d'ARN nucléaire (snRNA) (2 molécules dans le cas de U4/U6 snRNP), 7 protéines Sm (B/B', D3, D2, D1, E, F, et G) et plusieurs protéines spécifiques à chaque snRNP (**FIGURE 20**). Les protéines Sm interagissent avec U1 snRNP, U2 snRNP, U4 snRNP et U5 snRNP au niveau de leurs sites ARN Sm. U6 snRNP interagit avec des protéines Sm like (Lsm). En plus des snRNP, le spliceosome est composé d'un grand nombre de protéines régulatrices, de l'ordre de 170 protéines (Deckert et al. 2006; Herold et al. 2009).

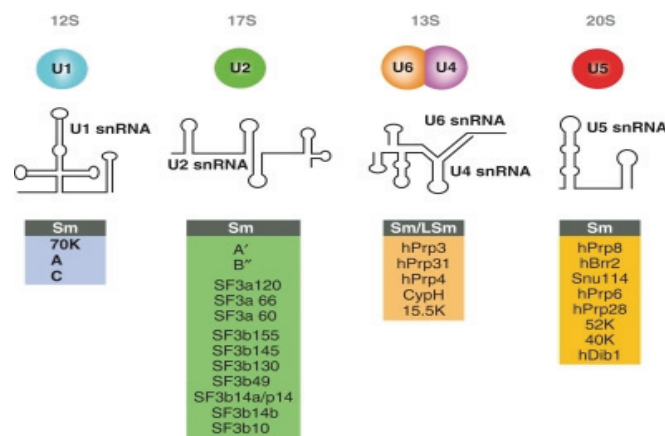
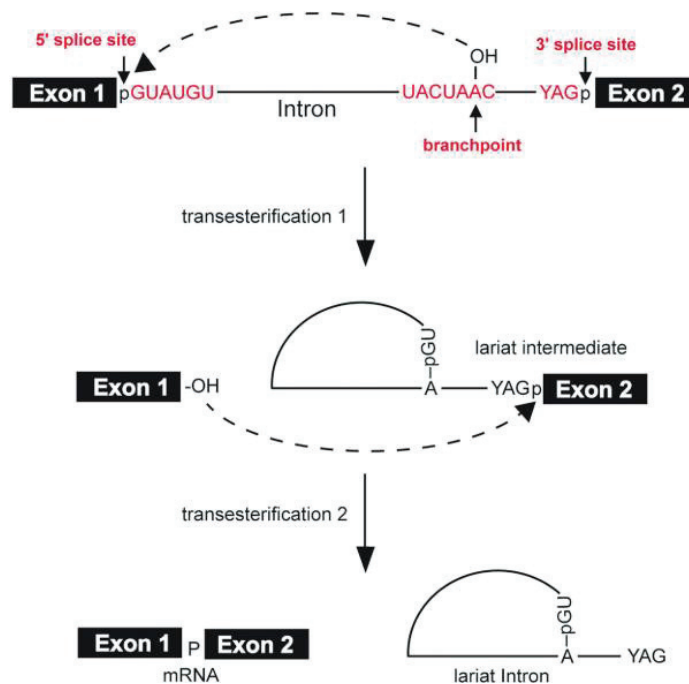


Figure 20. Composition protéique et structure secondaire des snRNA des snRNP du spliceosome humain. D'après (Will and Luhrmann 2011).

(Légende au dos)

Représentation des snRNP du spliceosome U2 dépendant (U1, U2, U2/U4, U5 et U6/U4/U5). Ils sont constitués d'un ARN nucléaire (snRNA), de protéines Sm (Sm-like pour U6), ainsi que plusieurs protéines spécifiques à chaque snRNP.

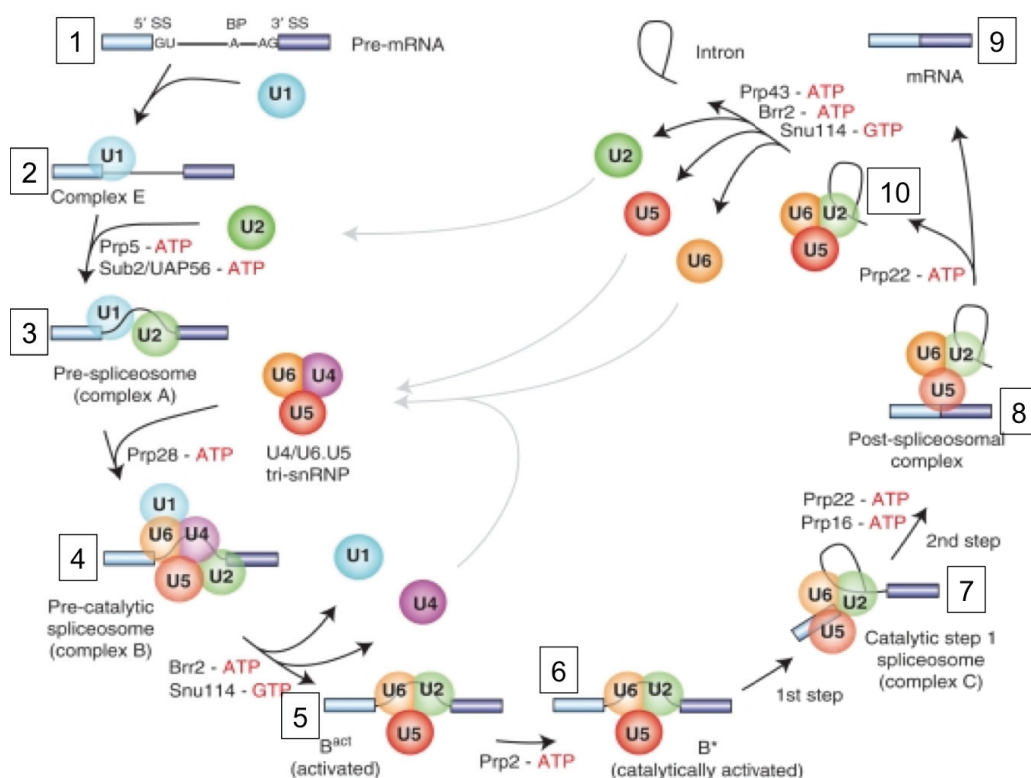
L'élimination des introns de l'ARN pré-messager par le spliceosome consiste en deux réactions de trans-estérification (**FIGURE 21**). Premièrement, le groupe 2' hydroxyle au niveau de l'adénosine appelée point de branchement réalise une attaque nucléophile sur le site d'épissage 5', formant une liaison phosphodiester entre le point de branchement et la partie 5' terminal de l'intron. Ensuite, le groupement 3' hydroxyle nouvellement libre de l'exon attaque le site d'épissage 3', formant une nouvelle liaison phosphodiester entre les 2 exons. Le produit de cette deuxième réaction de trans-estérification consiste en un produit de liaison des 2 exons ainsi que de l'intron libre en forme de lasso. Les composants du spliceosome peuvent alors se dissocier et les molécules sont recyclées pour la formation d'un nouveau spliceosome.



**Figure 21. Réaction d'épissage.** D'après (Chen and Cheng 2012).

Deux réactions de trans-estérification aboutissent au raboutage des deux exons ainsi qu'en la formation d'une structure en forme de lasso (lariat) correspondant à l'intron. La première réaction met en jeu le point de branchement et le site 5' d'épissage. La deuxième réaction met en jeu l'extrémité 3' libre de l'exon 1 avec le site d'épissage 3' au niveau de la jonction intron/exon 2.

A la différence de la plupart des enzymes, le spliceosome ne possède pas un site actif préformé, mais au contraire, le centre catalytique doit être assemblé *de novo* sur chaque intron. La **figure 22** décrit l'assemblage du spliceosome. Dans un premier temps, U1 snRNP interagit avec le site d'épissage 5' de l'ARN pré-messager, formant ainsi le complexe E. Ensuite, U2 snRNP s'associe au niveau du point de branchement, générant le complexe A. Par la suite, U4/U6 snRNP et U5 snRNP forment un tris-snRNP qui s'associe à l'ARN et qui forme le complexe B. S'en suit des changements conformationnels et le relargage de U1 et U4 snRNP, ce qui forme le complexe B actif, qui subira des remodelages pour former le complexe B catalytiquement actif (B\*). Le complexe B\* catalyse la première étape de trans-estérification, ce qui génère le complexe C. Après plusieurs réarrangements, la seconde réaction est réalisée par le complexe C et le spliceosome fini par se dissocier (**FIGURE 22**) (Hoskins and Moore 2012).



**Figure 22. Assemblage et désassemblage du spliceosome.** D'après (Will and Luhrmann 2011).

(1) ARN pré-messager (2) U1 snRNP interagit avec le site d'épissage 5' de l'ARN pré-messager, formant le complexe E (3) U2 snRNP s'associe au niveau du point de branchement, générant le complexe A (4) U4/U6-U5 snRNP forment un tris-snRNP qui s'associe à l'ARN, formant le complexe B (5-6) Relargage de U1 et U4 snRNP, formant le complexe B actif, qui subira des remodelages pour former le complexe B catalytiquement actif (7-8) Première et deuxième réaction de trans-estérification (9) Produit ARN messager final (10) Lariat : intron en forme de lasso.



## b. Reconnaissance des sites d'épissage

La première fonction du spliceosome est de reconnaître les sites d'épissages en 5' et 3' de l'intron (ou de l'exon). Pendant l'assemblage du spliceosome, les sites d'épissages ainsi que le point de branchement sont reconnus plusieurs fois par des protéines et des snRNA, assurant ainsi la précision de la réaction d'épissage. La stabilité du spliceosome et de son interaction avec la matrice ARN est due à un ensemble d'interaction de faible force. Cela permet une régulation fine de l'épissage, ainsi qu'un rapide désassemblage du spliceosome à la fin de la réaction. Les étapes de reconnaissance et de sélection des sites d'épissage sont influencées par des régions régulatrices flanquantes présentes sur l'ARN pré-messager. Ces séquences peuvent agir positivement ou bien négativement sur l'utilisation d'un site d'épissage. Elles peuvent être présentes aussi bien dans l'intron que dans l'exon (Singh and Valcarcel 2005). Ces régions cis-régulatrices de l'épissage agissent principalement en tant que site de liaison pour des facteurs trans-régulateurs de l'épissage, qui recrutent les snRNP du spliceosome à proximité des sites d'épissage dans le cas des facteurs activateurs, ou bien préviennent leur liaison dans le cas des répresseurs. Les séquences activatrices d'épissage sont souvent liées par la famille des protéines riches en sérine-arginine (protéines SR), alors que les séquences inhibitrices sont souvent liées par la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) **(FIGURE 23A)**. Au niveau du site 5' d'épissage, U1 snRNP s'apparie au niveau du site donneur en 5' de l'intron *via* la partie 5' du U1 snRNA. Cette interaction est stabilisée par des protéines de la famille SR et les protéines U1-70K et U1-C. En plus de l'interaction U1-5'SS, l'assemblage précoce du spliceosome implique la fixation de la protéine SF1/BBP (splicing factor 1 / branch binding protein) sur le point de branchement ainsi que du facteur auxiliaire U2AF au niveau du site riche en pyrimidine, en aval du point de branchement. Ces protéines se fixent en coopération, SF1/BBP interagissant avec la sous-unité 65kDa de U2AF (U2AF65). De plus, la sous unité 35kDa U2AF (U2AF35) fixe le dinucléotide AG du site d'épissage 3'. Ensemble, ces interactions moléculaires aboutissent à la formation du spliceosome E et jouent un rôle crucial dans la reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3' (Wahl et al. 2009) **(FIGURE 23B)**. Lors de la formation du complexe A du spliceosome, U2 snRNA interagit avec le point de branchement de l'ARN pré-messager et déplace SF1/BBP de manière ATP dépendante.



Cette interaction est stabilisée par les complexes protéiques U2, SF3a et SF3b, ainsi que U2AF65 (**FIGURE 23B**).

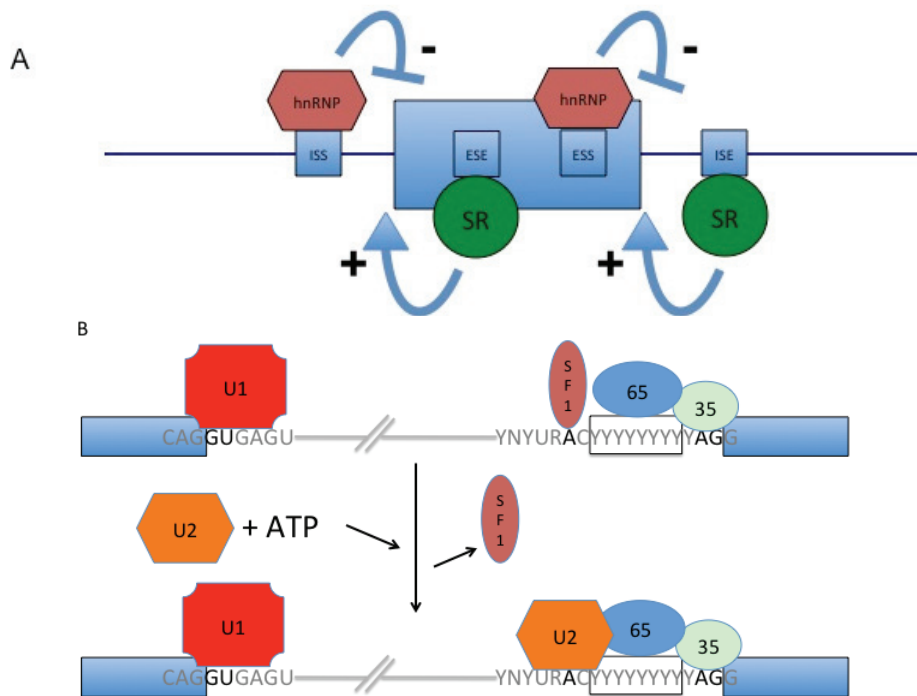


Figure 23. Reconnaissance des sites d'épissage par le spliceosome.

(A) Régulation des sites d'épissage par les protéines régulatrices hnRNP et SR. Les séquences introniques inhibitrices (ISS) et exoniques (ESS) sont liées par les protéines de la famille hnRNP, favorisant la perte de l'exon lors de l'épissage. Les séquences introniques activatrices (ISE) et exoniques (ESE) sont liées par les protéines de la famille SR, favorisant l'inclusion de l'exon lors de l'épissage. (B) Reconnaissance des sites 3' et 5' d'épissage par le spliceosome. Le site 5' d'épissage est reconnu et lié par U1 snRNP. De l'autre côté de l'intron (en 3'), le point de branchement, le site polypyrimidique ainsi que le site 3' d'épissage sont reconnus et liés par SF1, U2AF65 (65) et U2AF35 (35), respectivement. Un mécanisme ATP dépendant, va permettre l'arrivée de U2 snRNP et sa liaison au niveau du point de branchement, ainsi que le départ de SF1.

Les séquences des sites d'épissage sont définies comme fortes ou faibles, en fonction de leur proximité de séquence par rapport au consensus (Yeo and Burge 2004). Cela détermine l'affinité de reconnaissance par les facteurs d'épissage. En général, un site d'épissage fort conduit à un épissage constitutif. L'utilisation des sites d'épissages faibles dépend du contexte cellulaire (De Conti et al. 2013). La position des sites d'épissage forts et faibles donne naissance à plusieurs types d'épissage tel que : l'inclusion ou l'exclusion d'un exon, la rétention d'un intron, l'utilisation de site alternatif d'épissage en 5' et 3' (**FIGURE 24**) (Irimia and Blencowe 2012). L'utilisation de promoteur alternatif

ainsi que de site de polyadénylation alternatif ne sont pas à proprement parler des évènements d'épissage alternatif, mais participent eux aussi à la régulation qualitative des ARN. Leur régulation est étroitement liée à l'épissage puisque par exemple le choix d'utilisation de sites polyA peut être modulé par le choix des sites d'épissage de part et d'autre de ce dernier. En plus, de nombreux facteurs d'épissage jouent aussi un rôle dans le choix du promoteur et du site de polyadénylation. Pour un seul et même gène, plusieurs ARNm de structures différentes pourront ainsi être produits en fonction du contexte cellulaire. L'épissage alternatif est dépendant de l'état de stress de la cellule, de son activité métabolique et du stade de développement. Il a aussi été mis en évidence que l'épissage alternatif est tissu spécifique (Sebastian et al. 2013). L'effet tissu spécifique de l'épissage peut être expliqué par des différences d'expression de facteurs d'épissage entre les tissus. Par exemple, dans les cellules HeLa, le facteur d'épissage HuR est peu exprimé, on observe une perte de l'exon 6 du gène Fas. En comparaison, la forte expression de HuR au niveau des cellules HCT-116 est associée à l'inclusion de l'exon 6 (Izquierdo 2010).

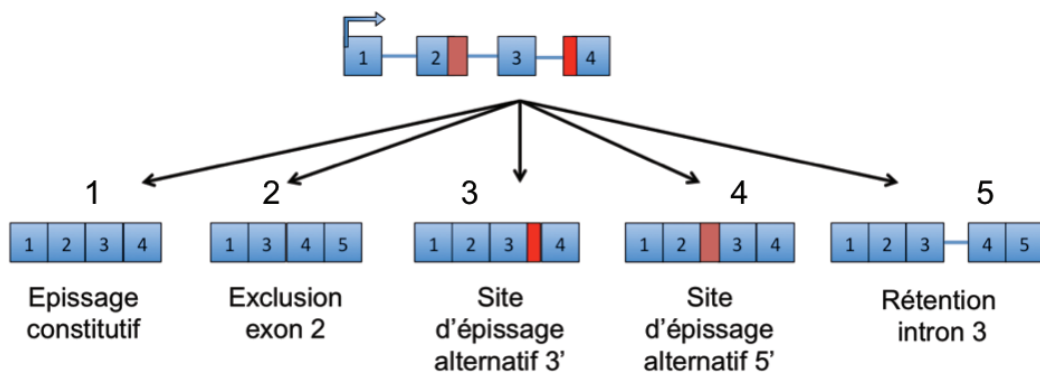


Figure 24. Différentes possibilités d'épissage alternatif d'un ARN.

Conséquences de l'épissage alternatif sur l'ARN messager final. (1) Epissage constitutif (2) Perte de l'exon 2 (3) Utilisation d'un site d'épissage alternatif 3' sur l'exon 4 (4) Utilisation d'un site d'épissage alternatif 5' sur l'exon 2 (5) Rétention de l'intron 3.

### c. Couplage entre épissage et transcription

De nombreuses données indiquent que l'épissage alternatif n'est pas seulement régulé par l'abondance relative des facteurs d'épissage, mais par un processus plus complexe impliquant la machinerie de transcription. Pendant de nombreuses années, les étapes de transcription et d'épissage étaient considérées comme indépendantes. De nombreuses

études ont montré que les mécanismes dits post-transcriptionnels tels que l'ajout de la cap en 5', l'épissage des introns, le clivage et polyadénylation en 3' et l'édition de l'ARN, sont connectés dans l'espace et dans le temps avec la transcription. Le couplage entre épissage et transcription a été démontré pour la première fois en 1988 par microscopie électronique chez la drosophile où l'assemblage du spliceosome, la formation de l'intron en forme de boucle et l'excision de l'intron de l'ARN naissant encore associé à l'ADN ont pu être observés (Beyer and Osheim 1988).

Chez l'homme, des preuves de couplage entre épissage et transcription ont été montrées par l'analyse par RT-PCR des transcrits DMD (Dystrophin), responsable des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. Ils ont pu observer l'accumulation de transcrits épissés en 5' de l'ARN, avant même que la transcription soit terminée en 3' du gène (Tennyson et al. 1995). Par la suite, les facteurs d'épissage ont été identifiés par immunoprécipitation au niveau des sites de transcription (Misteli et al. 1997; Neugebauer and Roth 1997). Ces dernières années, de nombreuses études ont confirmé le caractère co-transcriptionnel de l'épissage par des approches gène-spécifique ou à l'échelle du génome. Chez les eucaryotes, il a été montré que la majorité des introns sont excisés avant le clivage et la polyadénylation du transcrit et sa libération de la chromatine (Carrillo Oesterreich et al. 2010; Brody et al. 2011; Schmidt et al. 2011). Il a été montré *in vitro* que l'épissage est plus efficace sur un ARN en cours de synthèse, que sur un ARN pré-messager déjà synthétisé. De plus, la perte ou l'inhibition de phosphorylation de la partie C-terminale (CTD) de l'ARN polymérase II est associée à une diminution d'efficacité d'épissage (Ghosh and Garcia-Blanco 2000; Bird et al. 2004), indiquant que l'épissage est facilité lorsqu'il est co-transcriptionnel (**FIGURE 25**). Ces données n'excluent pas la possibilité de phénomènes d'épissage indépendant de l'élongation transcriptionnelle (Khodor et al. 2011; Vargas et al. 2011). L'efficacité co-transcriptionnelle de l'épissage est dépendant de l'espèce étudiée. En effet, une étude récente a démontré que la co-transcriptionnalité de l'épissage chez la souris est deux fois moins importante que chez la drosophile (Khodor et al. 2012).

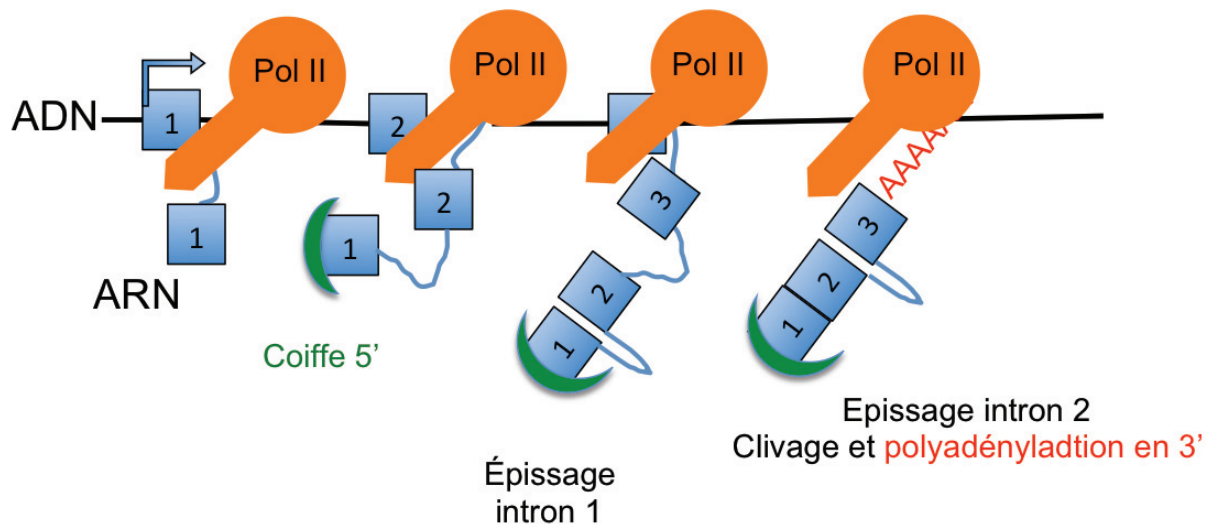


Figure 25. Intégration des processus de maturation de l'ARN pendant la transcription du gène.

Représentation du modèle actuel décrivant le couplage entre les processus de maturation de l'ARN et la transcription du gène. En orange est représentée l'ARN polymérase II. En vert est représentée la coiffe ajoutée lors de la maturation de l'extrémité 5' de l'ARN. Avant la fin de la transcription du gène, l'épissage des introns 1 et 2 peut déjà avoir lieu. Finalement, la maturation de la partie 3' de l'ARN par le clivage et l'ajout de la queue polyadénylée peut avoir lieu.

### A.3/ Régulation de l'épissage alternatif

#### a. Rôle du promoteur

La structure du promoteur ainsi que son occupation par les facteurs de transcription modulent l'épissage alternatif, appuyant ainsi le couplage fonctionnel entre transcription et épissage. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle du promoteur dans l'épissage en utilisant le système de transfection transitoire d'un minigène indicateur d'épissage alternatif sous la dépendance de différents promoteurs. Par exemple, l'exon EDI du gène de la fibronectine a été très bien étudié. Si le minigène est sous la dépendance du promoteur de l' $\alpha$ -globine, l'inclusion de l'EDI est dix fois plus faible que quand celui-ci est sous le contrôle du promoteur de la fibronectine (Cramer et al. 1997; Cramer et al. 1999). Cet effet du promoteur sur l'épissage a été montré aussi sur d'autres gènes tels que CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) (Pagani et al. 2003), ou FGFR (fibroblast growth factor receptor 2) (Robson-Dixon and Garcia-Blanco 2004) par exemple.

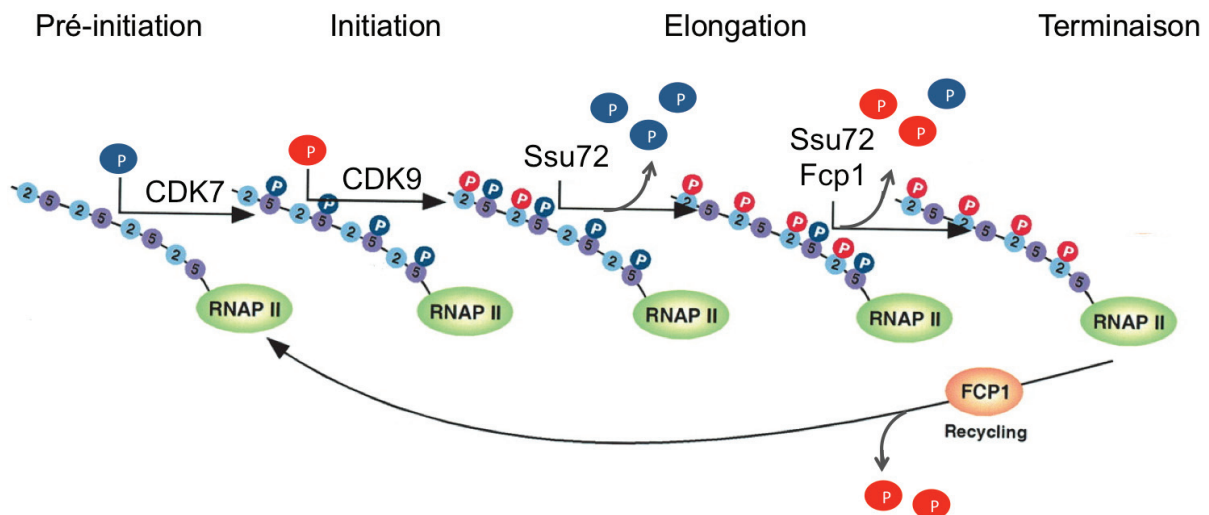
Un mécanisme possible pouvant expliquer cet effet du promoteur sur l'épissage est que le promoteur lui même pourrait être responsable du recrutement de facteurs d'épissage au niveau du site de transcription. C'est le cas pour les protéines WT-1 (Davies et al. 1998), DEK (Soares et al. 2006), SAF-B (Nayler et al. 1998) et CA150 (Goldstrohm et al. 2001) par exemples. Ces facteurs ont une dualité de fonction, ils sont impliqués dans la transcription du gène ainsi que dans son épissage (pour revue : (Allemand et al. 2008).

## b. Rôle de l'ARN polymérase II

### *i) Rôle du domaine C-terminal (CTD)*

Le domaine C-terminal (CTD) constitue la plus importante sous unité de l'ARN polymérase II. Le CTD régule plusieurs étapes de la biogenèse des ARNm, incluant l'addition de la cap en 5', l'épissage alternatif, ainsi que la maturation de la partie 3' de l'ARN. Le CTD consiste en une répétition (52 répétitions chez l'homme) d'une séquence de 7 aminoacides (Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>). La phosphorylation des sérines en position 2, 5 et 7 ainsi que les thréonines 1 et 4 jouent un rôle important dans la régulation de l'ARN polymérase II. Les deux modifications post-traductionnelles les plus étudiées et mieux caractérisées sont la phosphorylation des sérine en position 2 et 5 (**FIGURE 26**).

Par des études d'immunoprécipitation de la chromatine, il a été montré que le CTD de l'ARN polymérase II est hypophosphorylé au niveau du site de pré-initiation de la transcription (PIC). Ensuite, il est préférentiellement phosphorylé sur ses sérines en position 5 à l'initiation de la transcription par la kinase CDK7 (Cyclin dependent kinase 7). Ensuite les sérines en position 2 vont être phosphorylées par la kinase CDK9 (cyclin dependent kinase 9) du complexe P-TEFb (positive transcription elongation factor b) à l'étape de l'élongation de la transcription. En parallèle, les sérines en position 5 se font déphosphoryler par la phosphatase Ssu72. La phosphatase Fcp1 déphosphoryle les sérines en position 2. L'ARN polymérase II peut ainsi être recyclée (**FIGURE 26**).



**Figure 26. Phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II au cours de la transcription.**  
Adaptée d'après (Sims et al. 2004).

Au niveau du site d'initiation de la transcription, la CDK7 phosphoryle les sérines en positions 5, induisant le départ de l'ARNpolII du promoteur. La CDK9 phosphoryle par la suite les sérines en positions 2, induisant l'élongation de la transcription. La phosphorylation des sérines en position 5 est graduellement éliminée par la phosphatase Ssu72. Finalement, la phosphatase Fcp1 déphosphoryle les sérines en position 2. L'ARN polymérase II peut ainsi être recyclée.

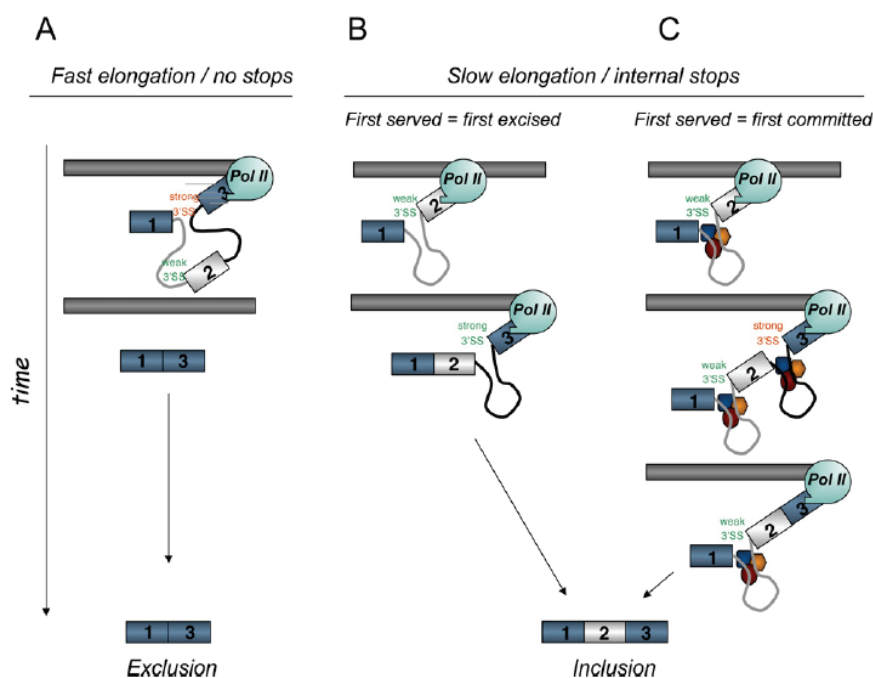
Ces modifications post-traductionnelles du CTD jouent un rôle dans la régulation de la transcription ainsi que la maturation des ARN (Hsin and Manley 2012). Les premières évidences du rôle du CTD dans la maturation des ARN proviennent d'expériences de délétion d'un certain nombre de répétition au niveau du CTD. Il a été montré que la perte de 5 répétitions suffit à induire des défauts de coiffe en 5' de l'ARN, d'épissage alternatif, ainsi que de maturation de la partie 3' de l'ARN (McCracken et al. 1997a; McCracken et al. 1997b). Par la suite, il a été montré que le CTD affecte le choix de sites d'épissage (Rosonina and Blencowe 2004; de la Mata and Kornblihtt 2006). Le CTD est capable de fixer de nombreuses protéines, notamment des facteurs de transcription, ainsi que des facteurs d'épissage tels que TCERG1, les protéines SR et U2AF (Hsin and Manley 2012). Des travaux récents ont mis en évidence une interaction entre U2AF et la RNA polymérase II. La phosphorylation des sérines en position 2 semble nécessaire au recrutement de U2AF65 (Gu et al. 2013). L'ensemble de ces données suggère que le CTD joue un rôle de plateforme embarquée impliquée dans le recrutement de facteurs d'épissage pouvant intervenir dans la reconnaissance des exons ainsi que dans la formation du complexe d'épissage. Ces mécanismes sont à la base du modèle de couplage transcription/épissage dit de recrutement (recruitment model).

## ii) Rôle de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II

Le modèle cinétique (kinetic model) est un autre mécanisme par lequel la machinerie de transcription influence l'épissage alternatif. Dans ce modèle, c'est la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II qui module les choix d'épissage alternatif. De façon générale, il est admis que plus l'ARN polymérase II est rapide, moins les exons alternatifs sont inclus dans l'ARNm final. En effet, le DRB (un inhibiteur de P-TEFb) ou bien encore la Camptothecin (un inhibiteur de la Topoisomérase I), qui sont connus pour réduire la vitesse d'élongation de la polymérase, induisent en majorité l'inclusion des exons alternatif (Ip et al. 2011). A l'inverse, le traitement des cellules par la Trichostatin A (un inhibiteur des histone déacétylases), connue pour induire l'ouverture de la chromatine et donc de faciliter l'élongation de l'ARN polymérase II, induit l'exclusion des exons alternatifs (Schor et al. 2009). De plus, le recrutement du domaine d'activation du facteur positif de l'élongation de la transcription VP16 du virus de l'herpes sur un minigène indicateur induit la perte de l'exons alternatifs dans l'ARN final (Nogues et al. 2002). Pour finir, il a été montré que des mutants du CTD de l'ARN polymérase II, moins rapides que la forme sauvage, sont capables de moduler l'épissage alternatif *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, ces mutants augmente l'inclusion de l'exon 33 de la fibronectine (de la Mata et al. 2003), et affecte le choix du site d'épissage en 5' du gène bcl-x (Montes et al. 2012b).

L'augmentation du taux d'inclusion des exons alternatifs lors du ralentissement de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II laissait penser a un modèle du « premier arrivé, premier servi » (**FIGURE 27B**). L'idée générale était que la faible vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II permettait l'excision de l'intron en amont de l'exon variable en premier, puis l'excision de l'intron en aval dans un deuxième temps. Cependant, ce modèle a été remis en question car il a été montré que l'excision de l'intron en aval de l'exon variable pouvait avoir lieu avant l'excision de l'intron en amont. La diminution de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II n'entraînait pas de changement de l'ordre dans lequel les introns étaient excisés. C'est la décision d'inclusion ou d'exclusion de l'exon alternatif qui est modifiée lors du ralentissement de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II, et non pas l'ordre dans lequel les exons sont excisés (**FIGURE 27C**).





**Figure 27. Rôle de la cinétique d'élongation de l'arn polymérase ii dans la régulation de l'épissage alternatif.**  
D'après (de la Mata et al. 2010).

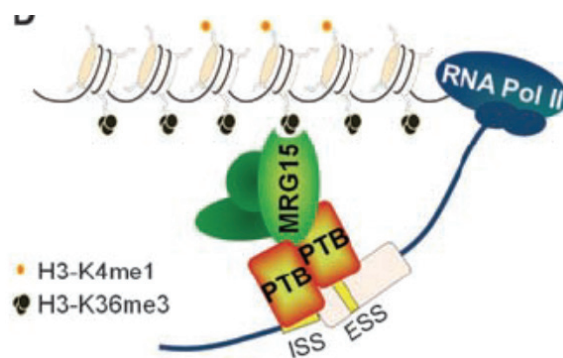
(A) La vitesse d'élongation élevée de l'ARN polymérase II est associée à la perte de l'exon alternatif 2 (B) Dans ce modèle dit *premier arrivé, premier servi*, la faible vitesse d'élongation permet à la machinerie d'épissage d'exciser l'intron en amont de l'exon 2 puis en aval de l'exon 2, incluant ainsi l'exon 2 dans l'ARN messager (C) Dans ce modèle alternatif, la faible vitesse d'élongation permet à la machinerie d'épissage de prendre la décision de garder l'exon 2 dans l'ARN messager final. Cependant, c'est l'intron en aval de l'exon 2 qui est excisé en premier, puis c'est au tour de l'intron en amont.

### c. Rôle du remodelage de chromatine

#### i) Rôle de la chromatine sur le recrutement des facteurs d'épissage

Les marqueurs épigénétiques influencent l'épissage alternatif notamment en modulant le recrutement de facteurs régulateurs d'épissage à la chromatine (Luco et al. 2010). Il a été montré chez *C. elegans*, que les exons sont enrichis en triméthylation de l'histone 3 sur la lysine 36 (H3K36me3) par rapport aux introns. De plus, les exons alternatifs présentent une diminution de ce marqueur par rapport aux exons constitutifs (Kolasinska-Zwierz et al. 2009). Au niveau du gène FGFR2, la triméthylation de l'histone 3 sur la lysine 36 (H3K36me3) entraîne la liaison de la protéine MRG15. La présence de MRG15 induit le recrutement du facteur inhibiteur d'épissage PTB, induisant l'exclusion de l'exon (**FIGURE 28**) (Luco et al. 2010).





**Figure 28. Couplage entre les modifications post-traductionnelles des histones et l'épissage alternatif sur le gène FGFR2.**

D'après (Luco et al. 2010).

ISS : site intronique inhibiteur d'épissage. ESS : site exonique inhibiteur d'épissage. MRG15 : histone tail-binding protein MORF related gene 15. PTB : polypyrimidine tract-binding protein.

### ii) Rôle de la chromatine sur la cinétique de l'ARN polymérase II

La position des nucléosomes ainsi que leurs modifications ont été montrés comme étant impliqués dans la définition des exons, avec une augmentation de la présence de nucléosomes au niveau des exons par rapport aux introns (Schwartz et al. 2009; Tilgner et al. 2009). Par exemple, la dépolarisation des neurones induit l'acétylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9ac), ce qui augmente la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II, et conduit à la perte de l'exon 18 de NCAM. À l'inverse, la différenciation des neurones induit l'inclusion de cet exon *via* un ralentissement de l'ARN polymérase II causé par une méthylation de cette même lysine (H3K9me) (Schor et al. 2009).

Le complexe SWI/SNF, impliqué dans le remodelage de la chromatine, active l'initiation de la transcription *via* le déplacement des nucléosomes aux niveaux des promoteurs. Plusieurs études ont montré le rôle de la sous-unité ATPase Brahma (Brm) du complexe SWI/SNF, dans la régulation de l'épissage alternatif *in vitro* et *in vivo* chez la Drosophile (Waldholm et al. 2011). Il a été montré que l'involution de Brm par shRNA dans une lignée humaine déficiente pour l'expression de BRG1 (l'autre ATPase de SWI/SNF), avait pour conséquences une inhibition de l'expression de *hTERT* ainsi qu'une dérégulation de son épissage alternatif au profit de l'isoforme dominante négative (Ito et al. 2008). Une autre étude a montré l'implication de Brm dans la régulation de l'épissage alternatif des gènes E-cadherin, BIM, Cyclin D1 et CD44. Sur le gène CD44, Brm induit l'inclusion des

exons variables, notamment l'exon alternatif v5. Brm interagit avec des facteurs d'épissage, notamment Sam68. Au niveau de la région variable de CD44, Sam68 interagit avec l'ARN pré-messager au niveau de l'exon variable 5. Cette fixation de Sam68 signalerait la présence d'un exon alternatif à Brm, qui induirait une modification de l'état de phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II (sérines 5 phosphorylées en particulier). Ces polymérases présentant des marqueurs de pause inhiberaient l'avancé des autres polymérases en amont, réduisant ainsi la vitesse d'élongation de la transcription et par conséquent l'inclusion des exons alternatifs (Batsche et al. 2006).

## **B/ Epissage alternatif et pathogénèse**

Etant donné l'importance de l'épissage alternatif dans la diversité du transcriptome et du protéome, il n'est pas surprenant que sa dérégulation soit impliquée dans le développement de maladies. Par exemple, il a été montré que la maladie Hutchinson-Glifford, induisant un vieillissement prématuré chez l'enfant, est causée par des mutations du gène de la lamine A/C nucléaire. Parmi ces mutations plusieurs touchent l'épissage de la lamine. La plupart des cas sont reliés à une mutation au niveau de l'exon 11. La séquence mutée semble être un site cis-activateur, qui induirait l'utilisation d'un site cryptique d'épissage. Le résultat est la formation d'une lamine tronquée de 150 paire de bases au niveau de l'exon 11 (De Sandre-Giovannoli and Levy 2006). Des défauts d'épissage alternatif ont pu être mis en évidence dans un grand nombre de maladies, concernant l'ensemble des tissus humains. C'est le cas pour les maladies du cœur (Lara-Pezzi et al. 2013), du poumon (Deng et al. 2013), du squelette (Fan and Tang 2013), le cerveau avec la maladie d'Alzheimer (Wong 2013) et de nombreux cancers.

### **B.1/ Epissage alternatif et cancer**

Les analyses transcriptomiques à grande échelle ont mis en évidence différents profils d'épissage entre les tissus sains et cancéreux, avec la présence d'isoformes d'épissage spécifiques du stade tumoral (He et al. 2009). Une étude *in silico* des données transcriptomiques indique des variations importantes de l'expression des facteurs d'épissage dans les cancers (Kirschbaum-Slager et al. 2004). L'usage des sites d'épissages consensus (GU-AG) semble être majoritairement diminué au niveau des

tumeurs au profit d'autres sites alternatifs (He et al. 2009). Des défauts de reconnaissance ainsi que des mutations des séquences cis-régulatrices ont été aussi mises en cause dans l'expression anormale d'isoformes d'épissage dans les cancers.

#### a. Mutations des éléments cis-regulateurs

##### *i) Mutations des sites accepteurs et donneurs d'épissage*

La mutation des sites donneurs-accepteurs GU-AG pourrait altérer la fixation des snRNP U1 et U2AFs. Ce type de réarrangement a été observé au niveau du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) impliqué dans le développement du cancer du colon. Une analyse des mutations du gène APC par le test de troncation des protéines (PTT) a révélé que la localisation des mutations déterminait la sévérité de la maladie chez les patients atteints du syndrome FAP (Familial Adenomatous Polyposis) prédisposant au cancer colorectal (Moisio et al. 2002). Parmi les formes agressives, il a été observé qu'une substitution d'une guanine par une adénine au niveau du site accepteur d'épissage de l'intron 7 du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) crée un site cryptique d'épissage et provoque la perte d'un nucléotide au début de l'exon 8. Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et la troncature de la protéine APC (Charames et al. 2002). Une forme atténuée de FAP a été reliée à l'insertion d'une thymine au niveau du site donneur d'épissage de l'intron 4, entraînant la perte de l'exon 4, un décalage du cadre de lecture et l'expression d'une protéine tronquée (Neklason et al. 2004). Ces données indiquent que la mutation de sites donneurs et accepteurs d'épissage peut altérer l'expression physiologique de la protéine APC et définir la sévérité de la pathologie.

##### *ii) Mutation des séquences cis-régulatrices d'épissage*

La protéine P53 joue différents rôles au niveau des voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la sénescence, le cycle cellulaire ainsi qu'au niveau des voies métaboliques. P53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers (Petitjean et al. 2007). De nombreux variants d'épissage aboutissant en une altération fonctionnelle de la protéine ont été rapportés

notamment au niveau du cancer du sein (Mills 2005). *Via* l'étude par RT-PCR d'un large panel de cancers du sein, il a été montré que les cellules tumorales présentaient des isoformes de p53 tronquées de la région N-terminale (Mills 2005). Ces variants résultent en majorité d'une rétention de l'intron 2 ou de la perte de l'exon 8. Une étude par séquençage des mutations de p53 a révélé que les mutations silencieuses de ce gène sont préférentiellement localisées sur les séquences cis-activatrices d'épissage (Lamolle et al. 2006). Les mutations du gène BRCA1 sont connues comme facteurs de susceptibilité aux cancers du sein et de l'ovaire. Par séquençage, il a été mis en évidence la présence d'une mutation héréditaire sur l'exon 18, au niveau d'une séquence activatrice d'épissage. Des essais d'épissage *in vitro* utilisant un minigène BRCA1 ont montré que la mutation de l'ESE (exonic splicing enhancer) sur l'exon 18 rend impossible la liaison de SF2/ASF à l'ARN et provoque la perte de l'exon 18 (Liu et al. 2001).

#### b. Dérégulation des facteurs trans-régulateurs de l'épissage

L'apparition de nombreuses isoformes d'ARNm dans les cancers n'est pas uniquement reliée aux mutations du gène, indiquant que des altérations de l'expression et/ou de l'effet des facteurs régulateurs de l'épissage interviennent.

L'abondance des facteurs d'épissage de la famille des protéines SR peut influencer l'apparition des isoformes d'ARNm. Cela a été bien démontré dans l'expression de la glycoprotéine CD44 impliquée dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration cellulaire. Les isoformes de CD44 sont générées par l'inclusion alternative de 9 exons variables (v2-v10) au niveau de l'ARNm mature. Les isoformes contenant les exons v5, v6 et v7 sont particulièrement surexprimées au niveau de nombreuses tumeurs. Ces variants sont impliqués dans l'invasion cellulaire ainsi que dans le caractère métastatique des tumeurs. Watermann et al. ont montré, par RT-PCR sur des cellules HeLa transfectées avec un minigène portant les exons v4 et v5, que le facteur d'épissage Tra2-β1 induisait l'inclusion de ces deux exons variables au niveau de l'ARNm (Watermann et al. 2006). Ces données ont été confirmées également sur des échantillons de cancer du sein. Le régulateur d'épissage SRm160 a été impliqué dans l'inclusion de l'exon v5 lorsque Ras était activé (Cheng and Sharp 2006). De façon

intéressante, l'inhibition de SRm160 par siRNA diminuait les propriétés invasives des cellules en test d'invasion en Matrigel. Ces données suggèrent qu'il puisse exister une corrélation entre l'expression de SRm160 et la progression tumorale.

Le rôle de protéine SR SF2/ASF a été également décrit dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un événement mis en jeu dans le développement embryonnaire mais aussi dans la métastase tumorale. Dans l'EMT, l'expression du proto-oncogène RON (Macrophage stimulating receptor) est impliquée dans la dissociation cellulaire, la motilité ainsi que l'invasion cellulaire.  $\Delta$ Ron est une isoforme constitutivement active, générée par l'exclusion de l'exon 11 de l'ARNm de Ron.  $\Delta$ Ron confère une augmentation de la motilité cellulaire et est retrouvée surexprimée dans les cancers du sein et du colon (Ghigna et al. 2005). Ghigna et al. ont montré, par transfection transitoire d'un minigène dans les cellules KATOIII, que l'exclusion de l'exon 11 de Ron dépendait de la liaison de SF2/ASF sur une séquence ESE de l'exon 12.

Ces données tendent à démontrer que les dérégulations de l'épissage alternatif participent à la progression tumorale et à l'agressivité de certains cancers. Cependant, elles ne permettent pas d'affirmer que ces altérations d'épissage puissent apparaître lors des phases précoces de la transformation cellulaire et participer à la carcinogénèse. Une étude chez la souris a pu mettre en évidence pour la première fois un effet oncogène d'un facteur d'épissage, SF2/ASF (Karni et al. 2007). La surexpression du gène SFRS1, codant SF2/ASF, dans différentes lignées cellulaires entraîne des amplifications chromosomiques identiques à celles observées dans la plupart des cancers du sein. Une expression ectopique de SFRS1 est suffisante pour la transformation de fibroblastes murins en culture et est corrélée à un enrichissement d'une isoforme oncogène de BIN1. L'injection de ces cellules à la souris « nude » permettait d'induire des sarcomes, démontrant clairement l'effet oncogène de SFRS1. La restauration du profil d'expression normal du gène SFRS1 dans ces cellules cancéreuses permettait une réversion du phénotype transformant. Les fonctions récemment décrites de SF2/ASF dans la progression du cycle et l'instabilité génétique pourraient en partie expliquer ses effets oncogènes (Li and Manley 2005).

Des mutations au niveau des facteurs trans-regulateurs de l'épissage ont aussi pu être identifiées comme étant responsable des variations d'épissage au niveau des cancers. Par exemple, au niveau des Sarcomes de Ewing, la fusion des protéines EWS et FLI1 a pour conséquence la production d'une isoforme oncogène du gène de la cyclin D1. Le facteur de transcription EWS ainsi que la protéine fusion EWS/FLI1 ont la même capacité à activer la transcription du gène de la cyclin D1. Par contre, EWS favorise l'expression de l'isoforme D1a, alors que la protéine de fusion EWS/FLI1 favorise l'expression de l'isoforme oncogène D1b *via* la diminution de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II (Sanchez et al. 2008).

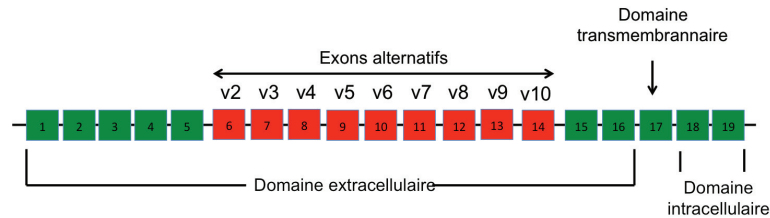
### C/ CD44, un gène modèle de l'épissage alternatif

Le gène CD44 code une glycoprotéine transmembranaire qui est le récepteur majeur de l'acide hyaluronique (HA). CD44 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la survie cellulaire. CD44 possède une grande hétérogénéité de structure à cause de la présence de 9 exon alternatifs au milieu de sa séquence codante, ainsi que de modifications post-traductionnelles (N-glycosylation et O-glycosylation). L'expression de ces différentes isoformes d'épissage dépend du type cellulaire ainsi que de l'état d'activation et de différenciation de la cellule. L'altération quantitative et qualitative de l'expression de CD44 a été observée dans de nombreux cancers, certains variants d'épissage étant de mauvais pronostic. De ce fait, la régulation de l'épissage alternatif de ce gène a été intensément étudiée (Hertweck et al. 2011).

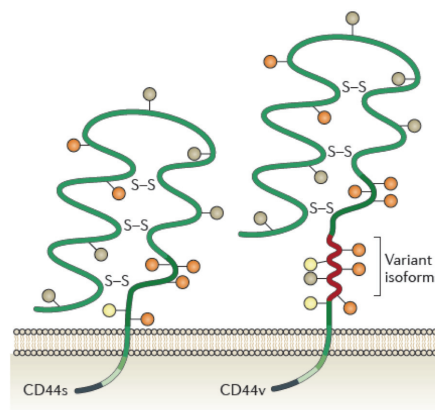
Au niveau du gène, CD44 est composé de 19 exons chez l'homme, parmi lesquels 9 sont inclus dans l'ARN messager de manière alternative (v2-v10) (**FIGURE 29A**). Les exons 1 à 14 codent la partie extracellulaire de la protéine, l'exon 17 code la partie transmembranaire, et les exon 18 et 19 codent la partie cytoplasmique. L'inclusion des exons alternatifs (v2-v10) a pour conséquences l'augmentation de la taille de la région extracellulaire de CD44 (**FIGURE 29B**). En western blot, CD44 présente un poids moléculaire de 80 à 220 kDa, qui varie en fonction de l'inclusion des exons variables, ainsi que des modifications post-traductionnelles. L'isoforme standard de CD44 est

l'isoforme CD44s, d'un poids moléculaire d'environ 80 kDa, ne présentant aucune inclusion d'exon variable (Hertweck et al. 2011).

A



B



**Figure 29. CD44 gène et protéine structure.**

(A) Organisation génétique du gène CD44. En rouge sont représentés les exons variable, en vert les exons constants (B) Représentation schématique de la protéine CD44s (à gauche) et CD44v (à droite). Cercles gris: N-glycosylation, cercles oranges: O-glycosylation. Adapté d'après (Zoller 2011).

Au niveau de sa région extracellulaire, CD44 interagit avec différents composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, les collagènes de Type 1 et IV, la lamin et son principale ligand : l'acide hyaluronique. Au niveau de son extrémité intracellulaire, CD44 est en connexion avec le cytosquelette *via* l'ankyrin et la famille des protéines ezrin-radixin-moeisn. Au niveau fonctionnel, CD44 est connue pour être impliquée dans les mécanismes de homing, d'adhésion cellule-cellule, de migration et d'invasion. L'interaction de CD44 avec certains facteurs de croissances tels que le TGF-beta, le VEGF-A ou bien encore le PDGF, régule l'expression quantitative et qualitative de CD44, modulant ainsi son affinité pour ses ligands, et donc ses fonctions cellulaires.

Alors que l'isoforme CD44s est exprimée de manière ubiquitaire, l'expression des variants d'épissage de CD44 (CD44v) est limitée à certains types cellulaires ainsi qu'au stade de différenciation des cellules. Par exemple, les cellules kératinocytaires sont connues pour exprimer l'isoforme la plus grande, portant l'ensemble des exons variables. L'expression du variant v6 quand à lui est augmentée dans la différenciation des cellules monocytaires alors qu'elle est diminuée dans la différenciation granulocytaire. De plus, l'expression des variants d'épissage de CD44 a pu être observée au niveau de différentes pathologies humaines. Il est bien démontré maintenant que l'expression de l'exon variant v6 confère aux cellules un pouvoir métastatique par exemple (Hertweck et al. 2011; Zoller 2011).

## **B.2/ Approches thérapeutiques**

Etant donné l'importance des dérégulations de l'épissage alternatif dans le développement de pathologie, de nombreux travaux tentent de cibler l'épissage alternatif comme thérapie. Ces actions thérapeutiques peuvent être ciblées sur un gène unique, restaurant ainsi l'épissage correct du gène en question, ou bien elles peuvent être plus globales, en ciblant la machinerie d'épissage en général.

### **a. Modulation thérapeutique de l'épissage alternatif**

L'utilisation d'oligonucléotides antisens (AONs) permet d'induire la perte d'un exon dans l'ARNm et ainsi restaurer le cadre de lecture. Cette stratégie est utilisée pour traiter la dystrophie musculaire de Duchenne. Une mutation ponctuelle du gène DMD codant la dystrophine entraîne la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle. 2 AONs fabriqués en parallèle ciblent spécifiquement l'exon 51 portant la mutation et le cache de la machinerie d'épissage, induisant ainsi sa perte lors de l'épissage (**FIGURE 30**) (van Deutekom et al. 2007; Kinali et al. 2009). Les premiers tests chez l'homme semblent prometteurs (Cirak et al. 2011; Goemans et al. 2011). Des stratégies similaires sont en cours d'étude pour traiter la maladie d'Hutchinson-Gilford causée par la mutation du gène LMNA (Osorio et al. 2011), l'ataxia-telangiectasia causée par la mutation du gène ATM (Du et al. 2011), ou bien encore la dystrophie musculaire



congénitale de Fukuyama causée par l'insertion d'un rétrotransposon dans le gène FCMD (Taniguchi-Ikeda et al. 2011).

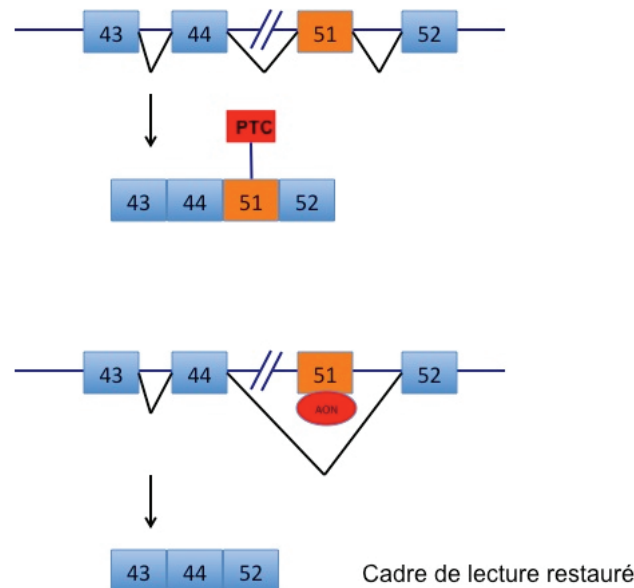


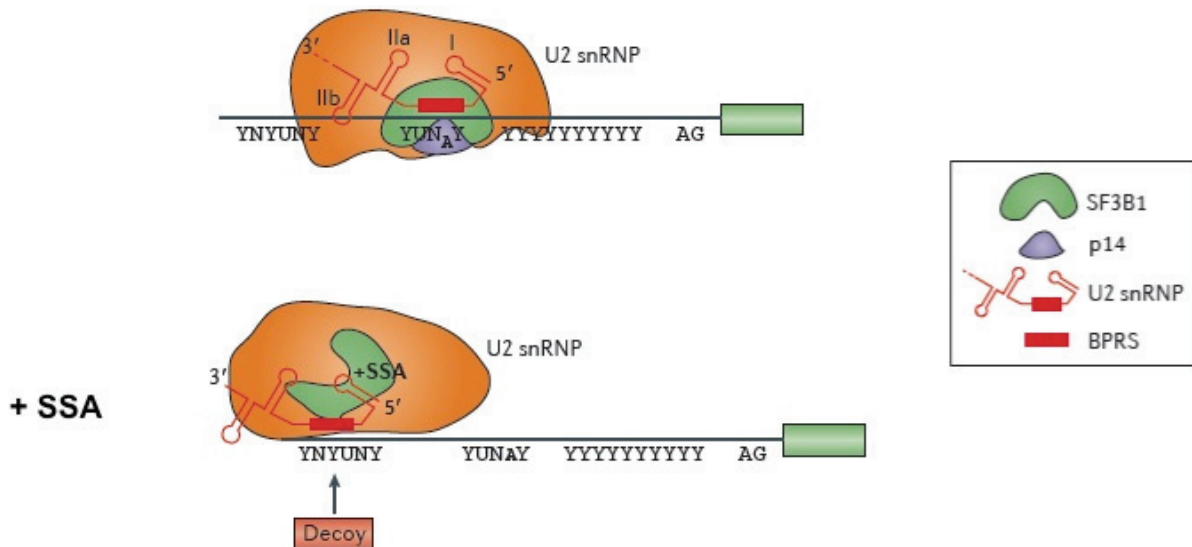
Figure 30. Restauration de l'épissage alternatif *via* l'utilisation d'oligonucléotide antisens (AON).

L'utilisation d'oligonucléotide antisens (AON) ciblant l'exon 51 induit l'exclusion de ce dernier dans l'ARN messager final, restaurant le cadre de lecture ouvert et aboutissant à l'expression d'une protéine fonctionnelle.

#### b. Le spliceosome : une nouvelle cible des drogues anti-tumoral

L'analyse de produits naturels ayant une activité anti-tumoral a permis d'identifier des composant provenant de *pseudomonas* spp. (FR901464) et *streptomyces* spp. (pladienolide), ayant un effet cytotoxique sur les lignées cellulaires en bloquant les cellules dans leur cycle. Des analogues synthétiques ont été fabriqués pour améliorer la stabilité et la solubilité des produits, aboutissant aux produits suivant : spliceostatin A (SSA), meayamycin, E7107 et sudemycin.

Il c'est avéré que ces drogues sont des inhibiteurs du spliceosome. En effet, elles ont toute comme cible le facteur d'épissage 3B (SF3B), qui appartient au complexe snRNP U2 du spliceosome (Kaida et al. 2007; Kotake et al. 2007). A l'échelle moléculaire, il a été montré que la SSA, en se liant avec SAP155 du complexe SF3B, déstabilise le complexe snRNP U2/ARN pré-messenger, et prévient ainsi la formation du spliceosome (**FIGURE 31**) (Roybal and Jurica 2010; Corriero et al. 2011).



**Figure 31. Effet de la spliceostatin A (SSA) sur la reconnaissance du site 3' d'épissage.**  
D'après (Bonnal et al. 2012).

La Spliceostatin A (SSA) empêche l'interaction entre SF3B1 et l'ARN pré-messager au niveau du point de branchement, et induit l'appariement de U2 snRNP avec une séquence dégénérée en amont.

La sudemycin est un des composés thérapeutiques encourageant. Elle régule l'épissage alternatif de gènes cellulaires tels que MDM2, le régulateur négatif de p53. Cette activité sur l'épissage alternatif a été observée aussi bien dans des lignées cellulaires, que *in vivo* au niveau de xénogreffe de tumeur humaine chez la souris. Les effets de cette drogue semblent beaucoup plus efficace sur les tissus transformés que sur les cellules normales (Fan et al. 2011; Lagisetti et al. 2013).

Deux études cliniques de phase 1 utilisant l'inhibiteur du spliceosome E7107 ont déjà été réalisées chez l'homme sur des patients présentant différents types de tumeurs solides (Eskens et al. 2013; Hong et al. 2013). Elles ont permis de valider *in vivo* l'effet de la drogue sur la modulation de l'épissage alternatif des PBMC circulant des patients, prouvant ainsi son efficacité chez l'homme. Par contre, aucuns effets sur la taille des tumeurs n'ont put être observés.

### **B.3/ Epissage alternatif et infections oncovirales**

Six virus oncogènes sont aujourd'hui clairement identifiés chez l'homme. Les virus hépatotropes HCV (Hépatite C Virus) et HBV (Hépatite B Virus) induisent une forte susceptibilité aux carcinomes hépatocellulaires. EBV (Epstein-Barr Virus) est associé à

de nombreux cancers tels que le lymphome de Burkitt et le cancer du nasopharynx. Les papillomavirus (HPV, Human Papilloma Virus) à haut risque tels que HPV-16 et -18 sont la cause de plus de 90% des cancers du col de l'utérus. HHV-8 ou KSHV (Kaposi Sarcoma associated Herpesvirus) est associé au sarcome de Kaposi et à la maladie de Castelman. Et enfin, HTLV-1 responsable de la leucémie T de l'adulte (ATLL).

Les infections oncovirales sont le plus souvent mutagènes et s'accompagnent de dérégulations transcriptionnelles qui sont fréquemment le résultat d'interactions moléculaires entre les protéines virales et les éléments cis- et trans-régulateurs de l'expression des gènes. Encore peu étudiées, les dérégulations de l'expression de variants d'épissage ont été toutefois identifiées dans la majorité des infections virales oncogènes suggérant que la régulation de l'épissage alternatif de gènes cellulaires puisse être une cible privilégiée lors de la carcinogenèse virale.

#### a. Redistribution des variants d'épissage dans les infections oncovirales

Comme abordé précédemment, certaines isoformes de CD44 sont associées à la tumorigénicité ainsi qu'au caractère invasif des cellules. L'infection par EBV induit l'apparition d'isoformes CD44 portant des exons alternatifs alors que seul l'isoforme CD44 sans exon variable est exprimée dans les lymphocytes B quiescents non infectés (Kryworuckho et al. 1995). Ces variants sont aussi retrouvés dans les cellules de lymphomes de Burkitt (LB) infectés par EBV et non dans les LB non infectés suggérant un rôle actif de EBV dans la production de ces variants. L'expression de la protéine virale EBNA-2 serait essentielle à l'expression de ces isoformes de CD44 (Kryworuckho et al. 1995).

Les réarrangements des régions variables du CD44 ont été également détectés dans les infections à HPV-16. Dall et al. ont montré par immunohistochimie et cytométrie en flux, que l'infection par HPV-16 induisait l'expression d'une isoforme de CD44 contenant les exons alternatifs v7 et v8 (Dall et al. 1996). La détection des cellules exprimant CD44 v7/v8 augmentait au cours de la carcinogenèse du col de l'utérus, et concernait tous les échantillons tumoraux suggérant une participation de cette isoforme dans les processus carcinogènes.

## b. Dérégulation de l'expression des facteurs d'épissage par les protéines virales

Le profil d'expression des facteurs d'épissage influence le phénotype cellulaire et définit la spécificité tissulaire. La modulation de l'expression des gènes de l'épissage par les virus pourrait contribuer à générer un environnement cellulaire propice aux infections oncogènes.

Il a été observé que l'infection par HPV-16 dérégulait positivement l'expression de ASF/SF2 et de son facteur antagoniste hnRNPA1 au cours de la différenciation épithéliale (Mole et al. 2009). Mole et al, ont montré par immunohistochimie et Western Blot semi quantitatif que l'expression de E2-HPV16 induisait l'expression des facteurs d'épissage SF2/ASF, SRP20 ainsi que SC35.

Au niveau de l'infection par le HCV, il a été observé une augmentation de l'expression de l'ARN hélicase DDX3, qui est nécessaire pour la réplication du virus. DDX3 possède un domaine RS, suggérant qu'elle peut interagir avec/ou agir comme les protéines SR. Les protéines core du virus HCV sont capables d'interagir avec DDX3. Les conséquences sur l'épissage, de l'augmentation de l'expression de DDX3 ainsi que ses interactions avec les protéines cores du virus restent à démontrer (Owsianka and Patel 1999; Ariumi et al. 2007).

## c. Des protéines virales dans la machinerie d'épissage

### *i) Protéines SR codées par les oncovirus*

Certaines infections à HPV (HPV-EV) sont associées à l'épidermodysplasie verruciforme, une pathologie héréditaire rare. Certains HPV-EV ont un potentiel oncogène. La protéine E2-HPV-EV contient des répétitions du dipeptide RS, suggérant une fonction d'épissage. E2 interagit avec des protéines SR et snRNPs. Les études fonctionnelles ont démontré que cette région RS-rich de E2 pouvait faciliter l'épissage des transcrits transactivés par E2 elle-même (Lai et al. 1999).

La protéine core d'HBV, impliquée dans la synthèse de l'ADN viral et la formation de virions, possède une région C-terminale composée également de répétitions SR (de type SRPPP) et qui est la cible de phosphorylation par SRPK1/2, kinases de facteurs d'épissage (Daub et al. 2002). Cependant les effets de la protéine core sur l'épissage restent à démontrer.

### *ii) Interactions de protéines virales avec les facteurs SR*

Différentes études ont pu démontrer que certaines protéines d'oncovirus altéraient les mécanismes de maturation post-transcriptionnelle en interagissant directement avec les facteurs d'épissage. Ces propriétés ont été démontrées pour les protéines E2, E6 et E7 du virus HPV-16. E2, E6 et E7 d'HPV-16 peuvent inhiber l'épissage d'un pré-ARNm contenant des sites d'épissage sub-optimaux. E2 et E6 ont la capacité de fixer le pré-ARNm et d'interagir avec de nombreuses protéines de la famille SR incluant SRp30, SRp40 et SRp75 (Bodaghi et al. 2009). Ces interactions sont susceptibles d'interférer avec le recrutement et la formation des complexes d'épissage au niveau du pré-ARNm. Ces données suggèrent que les effets post-transcriptionnels des protéines E2, E6 et E7 d'HPV-16 pourraient jouer un rôle dans la réplication et la carcinogenèse virale.

La protéine non structurale NS5A de HCV possède un rôle trans-activateur de l'expression de gènes cellulaires impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. Il a été montré par hybridation soustractive (SSH) que cette protéine était également capable d'induire spécifiquement l'expression de variant d'épissage du gène NS5ATP2 (Yang et al. 2004).

Dans le cadre de l'infection par EBV, une étude a mis en évidence par RT-PCR sur minigène STAT1, l'implication de la protéine virale SM dans l'induction de l'expression de STAT1, et en particulier dans l'augmentation disproportionnée du niveau d'expression de l'isoforme STAT1 $\beta$ , dominant négatif de STAT1 $\alpha$  (Verma and Swaminathan 2008). Le taux relatif de ces deux isoformes affecte les mécanismes d'apoptose et de résistance à l'infection virale et mycobactérienne. SM interagit directement sur le pré-ARNm de STAT1, et entre en compétition directe avec le facteur d'épissage cellulaire SF2/ASF. La protéine virale SM a été montrée pouvant interagir

avec deux membres de la famille SR : SRSF3 et SRSF10 (Calderwood et al. 2007; Verma et al. 2010). EBNA5, une autre protéine du EBV a été montrée par co-immunoprécipitation puis spectrométrie de masse, comme interagissant avec de nombreux facteurs d'épissage tels que SRSF1, SF3B, U1A, U2B et différents membres de la famille des hnRNP (Forsman et al. 2008). Récemment, il a été montré qu'un ARN non codant de EBV, nommé EBER1, interagissait avec les facteurs UPF1, une protéine majeure du NMD. De manière intéressante, EBER1 peut entrer en compétition avec UPF1 pour la fixation des ARN, pouvant ainsi réguler leur stabilité. De plus, EBER1 interagit aussi avec le facteur d'épissage hnRNP D (Lee et al. 2012).

ORF57 est une protéine homologue de la protéine SM du HBV, codée par le HHV8 (KSHV). ORF57 co-localise avec SRSF2 dans le noyau. De plus, elle est retrouvée complexée avec U2AF et hnRNP K. Bien qu'elle soit importante pour l'expression du virus et qu'elle interagisse avec des facteurs d'épissages, son rôle sur l'épissage de gènes cellulaires n'a pas encore été montré (Majerciak et al. 2007; Majerciak et al. 2008; Pilkington et al. 2012).

L'ensemble de ces données de la littérature indiquent que les virus oncogènes HPV, EBV, HCV, HBV ont développé diverses stratégies pour influencer positivement ou négativement les processus d'épissage alternatif.

## **C/ HTLV-1 et épissage alternatif**

L'impact de l'infection par HTLV-1 sur la régulation de l'épissage alternatif des gènes cellulaires et son implication dans le développement de la pathologie n'ont pas été directement étudiés. Un nombre limité d'études a pu observer des dérégulations de l'épissage alternatif de gènes cellulaires.

### ***C.1/ Dérégulation de l'épissage alternatif dans les cellules infectées par HTLV-1***

L'antigène Fas est un récepteur membranaire impliqué dans la mort cellulaire. Il existe deux isoformes de Fas issues d'un épissage alternatif : une forme membranaire mFas et une forme soluble sFas. L'interaction de mFas avec son ligand contrôle la durée de vie

des lymphocytes périphériques sous l'influence de sFas. Sugahara et al. ont montré par cytométrie en flux, une expression anormale de sFas et mFas au niveau des PBMC d'ATL fraîchement isolées (N=49) par rapport aux individus infectés sans signe de malignité (N=14) ainsi que des individus contrôles non infectés (N=25) (Sugahara et al. 1997). Ils ont montré par test ELISA, que le niveau de sFas dans le sérum est très fortement corrélé au stade tumoral de l'infection.

Par ailleurs, Horiuchi et al. ont montré que les cellules T CD4+ infectées par HTLV-1 produisaient par épissage alternatif la forme soluble du récepteur à l'IL6 (sIL-6R) résultant d'un épissage alternatif du gène IL-6R. Des études *in vitro* ont montré que le complexe sIL-6R/IL-6 induisait, entre autres, la prolifération cellulaire. La forme épissée sIL-6R a été détectée dans le sérum de patients ATL (N=12) ainsi que dans celui des patients infectés TSP/HAM (N=13), à un taux supérieur à celui observé chez les individus sains (N=23) (Horiuchi et al. 1998). Le taux élevé d'expression de sIL-6R et de sFas chez les patients HTLV-1 pourrait participer à la progression de la maladie.

Il a été aussi mis en évidence une surexpression des exons alternatif v6 et v10 du gène CD44 au niveau des PBMC de patients TSP/HAM (N=15) par rapport aux donneurs sains (N=15) (Matsuoka et al. 2000). Ces exons étant déjà connus pour jouer un rôle dans les processus de migration et l'invasion cellulaire, l'apparition de ces isoformes dans la population de cellules T circulantes pourraient participer au passage de la barrière hémato-encéphalique et aux lésions au niveau du système nerveux central chez les patients atteints de TSP/HAM.

De plus, plusieurs études ont mis en évidence une surexpression de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-XL liée à l'infection par HTLV-1. Bcl-XL a été montré surexprimée dans les lignées cellulaires infectées par HTLV-1, immortalisées ou transformées par rapport aux contrôles non infectées. Cette surexpression de l'isoforme Bcl-XL a aussi été montrée *in vivo* au niveau de PBMC provenant de patients ATL (Nicot et al. 2000a). La surexpression de Bcl-XL au niveau des lymphocytes T CD4+ provenant de patient TSP/HAM a aussi été mise en évidence. De plus, cette surexpression de l'isoforme Bcl-XL était associée à une résistance des cellules à l'apoptose dépendante des mitochondries, induite par l'etoposide (Hamasaki et al. 2001).

Pour finir, une étude a récemment mis en évidence un défaut d'expression et d'épissage alternatif du facteur de transcription Helios au niveau des cellules d'ATL (Asanuma et al. 2013). 32/37 ATL présentaient des défauts d'épissage d'Hélios en comparaison avec des personnes infectées par HTLV-1 sans signe de malignité. Ces ATL expriment une isoforme dominante négative de Hélios. L'expression de cette isoforme dans des cellules Jurkat, de même que l'inhibition par shRNA des isoformes endogènes de Hélios, induisait la prolifération des cellules. Ces résultats sont consistant avec les données de la littérature définissant Hélios comme un suppresseur de tumeur (Zhang et al. 2007).

### **C.2/ Tax et épissage alternatif**

La surexpression de l'isoforme Bcl-XL mise en évidence *in vivo* chez les patients ATL et TSP/HAM, a pu être reliée à l'expression de la protéine Tax de HTLV-1. En effet, il a été montré dans des lignées cellulaires lymphoïdes, que Tax active l'expression de l'isoforme Bcl-XL de manière NF-kB dépendante (Tsukahara et al. 1999; Nakashima et al. 2003).

Plusieurs évidences laissent à penser que Tax pourrait avoir un effet sur l'épissage alternatif d'autres gènes cellulaires. Au niveau moléculaire, dans les lignées cellulaires transfectées par Tax, Tax co-localise et interagit avec des facteurs d'épissage. En effet, au niveau du noyau, Tax s'organise en corps nucléaires qui chevauchent avec les corps nucléaires riches en facteurs d'épissage tels que sc35 et Sm (Semmes and Jeang 1996). Au niveau du promoteur viral, il a été montré que SRL300, une protéine de la famille des « SR-related proteins » impliquées dans la régulation du spliceosome, est directement recrutée par Tax lors de la transactivation des gènes viraux (Youn et al. 2003). Les conséquences des interactions de Tax avec SRL300 sur l'épissage des transcrits viraux n'ont pas été abordées. De plus, les données récentes impliquant Tax et P-TEFb dans la régulation de la phosphorylation de l'ARN polymérase II (Zhou et al. 2006; Cho et al. 2007; Cho et al. 2010) pose la question du rôle de Tax dans le couplage transcription/épissage alternatif, mettant en jeu la processivité et la vitesse d'élongation de la fourche transcriptionnelle (de la Mata et al. 2003). Pour finir, nous avons vu que Tax était capable d'interagir avec les enzymes responsables du remodelage de la chromatine telles que la Topoisomérase I et la sous unité BRG1 du complexe SWI/SNF



(Wu et al. 2004; Lemasson et al. 2006; Easley et al. 2010). Toutes ces interactions ont été découvertes lors des différentes études de l'activation de la transcription du virus par Tax. Leurs conséquences sur l'expression ainsi que l'épissage alternatif de gènes cellulaires restent à démontrer.

Récemment, notre laboratoire a montré que la protéine Tax est un répresseur de l'expression d'*hTERT* codant la sous unité catalytique du complexe télomérase (Gabet et al. 2003). Les études des mécanismes sous-tendant la répression d'*hTERT* ont permis de montrer que Tax recrute la protéine DEK au niveau du promoteur d'*hTERT* dans les cellules HeLa exprimant Tax (Karam et al. 2014). Outre ces fonctions de régulation transcriptionnelle, DEK a été décrite comme un élément essentiel à la sélection des sites accepteur d'épissage *via* son interaction avec U2AF35 (Soares et al. 2006). DEK est également retrouvée au niveau des jonctions exon-exon impliquées dans l'export nucléaire des ARNm (McGarvey et al. 2000). De façon intéressante, des données préliminaires au laboratoire montre que l'expression de Tax dans des cellules HeLa dérégule l'épissage alternatif de *hTERT*.

### 3/ Problématique et objectifs de la thèse

Les données de la littérature présentées dans cette introduction mettent clairement en évidence l'importance des mécanismes de maturation de l'ARN pré-messager dans la régulation de l'expression des gènes et la diversité du transcriptome et du protéome, et *in fine* du phénotype et du comportement cellulaire. Parmi ces mécanismes, l'épissage alternatif est défini comme un acteur majeur de la régulation de l'expression génique tant au plan qualitatif que quantitatif. Les dérégulations de l'épissage alternatif sont de fait fréquemment associées aux pathologies humaines. En particulier, certaines isoformes d'épissage ont pu être reliées à l'initiation et/ou la progression tumorale (Karni et al. 2007). Dans les contextes d'infections oncogènes, les altérations de l'épissage alternatif ont été décrites dans la persistance et les effets cytopathogènes de certains virus. Néanmoins, en dépit d'un mode de répllication étroitement lié aux mécanismes cellulaires, les effets des infections deltarétrovirales, et notamment de HTLV-1, sur les processus d'épissage alternatif restent aujourd'hui inconnus.

La structure du promoteur, le recrutement des facteurs et co-facteurs de la transcription et de l'épissage, le remodelage de la chromatine, et la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II sont autant de facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif *in vivo*. Aussi, les données de co-localisation de l'oncoprotéine virale Tax avec les facteurs d'épissage SC35, Sm, et SRL300, les activités de Tax dans le recrutement des facteurs contrôlant la régulation chromatinienne, l'initiation et l'élongation de la transcription, nous ont amené à rechercher si, outre les modifications transcriptionnelles déjà largement décrites, HTLV-1 pouvait également induire une reprogrammation qualitative du transcriptome cellulaire en influençant les mécanismes d'épissage alternatif.

Mes travaux de thèse ont abordé ces questions. La première partie de mon travail a consisté à évaluer si les cellules T CD4+ infectées *in vivo*, transformées ou non, pouvaient présenter des signatures d'expression d'exon spécifiques de leurs phénotypes comparés aux cellules non-infectées. La seconde partie décrit une approche moléculaire des mécanismes qui sous-tendent les altérations d'épissage associées à l'infection. En particulier, j'ai recherché si les modifications de l'expression génique induite par Tax, perturbateur de la transcription des cellules infectées, pouvaient s'accompagner de modifications qualitatives des transcrits. A travers l'étude du gène CD44, mes données proposent ici un rôle de NF- $\kappa$ B dans les modifications du couplage transcription/épissage dans les cellules Tax positives.

## RESULTATS

**1/ Partie 1 : Les profils d'expression d'exons des cellules T-CD4+ infectées constituent des signatures spécifiques des phénotypes non-transformés et ATLL.**

## A/ Introduction

Au cours des dernières décennies, les études transcriptomiques à large échelle ont confirmé le rôle des dérégulations transcriptionnelles des gènes cellulaires lors du processus de leucémogénèse associé à l'infection par le HTLV-1, notamment *via* la dérégulation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, le système télomère/téломérase, la réparation de l'ADN, la réponse immunitaire et inflammatoire (Pise-Masison et al. 2002; Koga et al. 2004; Tsukasaki et al. 2004; Fung et al. 2005; Sasaki et al. 2005; Olierie et al. 2010; Watanabe et al. 2010; Kress et al. 2011; Chevalier et al. 2012). En plus de la régulation quantitative de l'expression de gène, l'homéostasie du transcriptome des cellules humaines repose sur des processus additionnels, régulant qualitativement le produit des gènes. L'épissage alternatif est un mécanisme majeur de la diversité du transcriptome, qui est étroitement lié à la transcription, aussi bien dans l'espace que dans le temps (Kornblihtt et al. 2013). Grâce au développement de nouvelles techniques d'analyse quantitative à large échelle, telles que le RNA-seq ou bien les puces exons spécifiques, il a été clairement démontré qu'il existe des dérégulations d'épissage alternatif associées au développement de pathologies. De plus, de nombreuses études ont démontré une dérégulation de l'épissage alternatif associée à l'infection par des virus oncogènes. Quelques travaux ponctuels ont pu mettre en évidence une dérégulation d'épissage alternatif lors de l'infection par le HTLV-1. Par exemple, il a été montré que les cellules infectées par HTLV-1 exprimaient des variants d'épissage des gènes CD44, IL-6 et du récepteur à l'IL-2 (Horiuchi et al. 1997; Matsuoka et al. 2000; Horiuchi et al. 2006).

La problématique de notre étude était donc de rechercher s'il existait des dérégulations d'épissage alternatif associées à l'infection par le virus HTLV-1. Pour aborder la question de la dérégulation de l'épissage alternatif dans le contexte de l'infection par HTLV-1, nous avons évalué les profils d'expression des exons de cellules T CD4+ infectées par HTLV-1 provenant d'individus naturellement infectés sans malignité, ainsi que des échantillons de cellules infectées transformées (ATLL). L'expression quantitative et qualitative des exons a été analysée par puces exons spécifiques (Affymetrix).

## B/ Résultats

### *B.1/ Modification de l'expression d'exons dans les cellules d'ATLL et des clones non transformés T CD4+ infectés par HTLV-1*

Les profils d'expression des exons de cellules T CD4 + infectées par HTLV-1, provenant d'individus naturellement infectés, avec ou sans malignité, ont été évalués en utilisant les puces exons spécifique (Affymetrix). Contrairement aux puces d'expression classiques qui sont basées sur des sondes reconnaissant la partie 3' des ARN, ces nouvelles puces sont basées sur des sondes couvrant la totalité des exons des gènes. Il est ainsi possible d'analyser le niveau de transcription global d'un gène en calculant la médiane d'expression de l'ensemble de ces exons, mais aussi d'analyser les modifications d'expression à l'échelle de l'exon en analysant le taux d'expression d'un exon donné normalisé à l'expression global du gène. Au total, 3 échantillons d'ATLL ainsi que 12 clones T CD4+ (6 infectés/6 non infectés) provenant de patients infectés par le virus, ont été analysés sur puces exons. Contrairement aux ATLL, ces clones T CD4+ infectés sont non transformés car dépendant de l'interleukine 2. Nous les considérons comme des cellules pré-leucémiques car elles sont infectées et peuvent donc potentiellement aboutir au développement d'une ATLL. Puisqu'il est connu que l'état d'activation des lymphocytes modifie l'épissage alternatif (Ip et al. 2007; Whistler et al. 2010), les clones T CD4+ ont été stimulés ou non par la PHA. Par cette approche, nous assumons que les variations significatives de l'expression d'exons entre les cellules infectées (activées ou non) et les cellules non infectées seront majoritairement dues au statut infectieux des cellules.

Afin de mettre en évidence les modifications d'expression d'exons lors de l'infection par HTLV-1, nous avons analysé les profils d'expression d'exon de clones T CD4+ infectés non transformés, en comparaison à celui de clones non infectés. Le diagramme de Venn en haut de la **figure 32**, représente le nombre de gène quantitativement modifiés (en blanc), qualitativement modifiés, c'est à dire quantitativement non modifiés mais présentant une dérégulation de l'expression d'au moins un de leur exons (en gris foncé), ou bien les deux (gris clair). Au total, 2414 exons (1327 gènes) présentaient des modifications d'expression entre les clones infectés et non infectés. Parmi les gènes

présentant des modifications d'expression d'exons, seulement 682 (51%) étaient aussi modifiés à l'échelle du gène, alors que 645 ne présentaient pas de modification d'expression globale (gris foncé). Par ailleurs, 877 gènes étaient uniquement modifiés quantitativement (blanc). Ces données montrent qu'au niveau des cellules non transformées, en plus des modifications transcriptionnelles traditionnellement observées, les cellules infectées par HTLV-1 présentent des modifications significatives d'expression d'exons alternatifs de nombreux transcrits. De plus, 49% des gènes modifiés en épissage ne sont pas modifiés quantitativement.

En parallèle, l'expression des exons des cellules d'ATLL a été aussi analysée (**FIGURE 32, bas**). Le nombre d'exons modifiés dans leur expression était 11 fois supérieur à celui des cellules infectées non transformées (27805 vs 2414). De plus, la proportion d'exons alternatifs portés par des gènes quantitativement modifiés était significativement plus importante dans les ATLL : 72% vs 51% ( $p < 0,05$ ). 2370 gènes étaient par ailleurs uniquement quantitativement modifiés (en blanc). L'ensemble de ces résultats indique que les altérations d'expression d'exons diffèrent entre les ATLL et les clones HTLV-1 positifs non transformés.

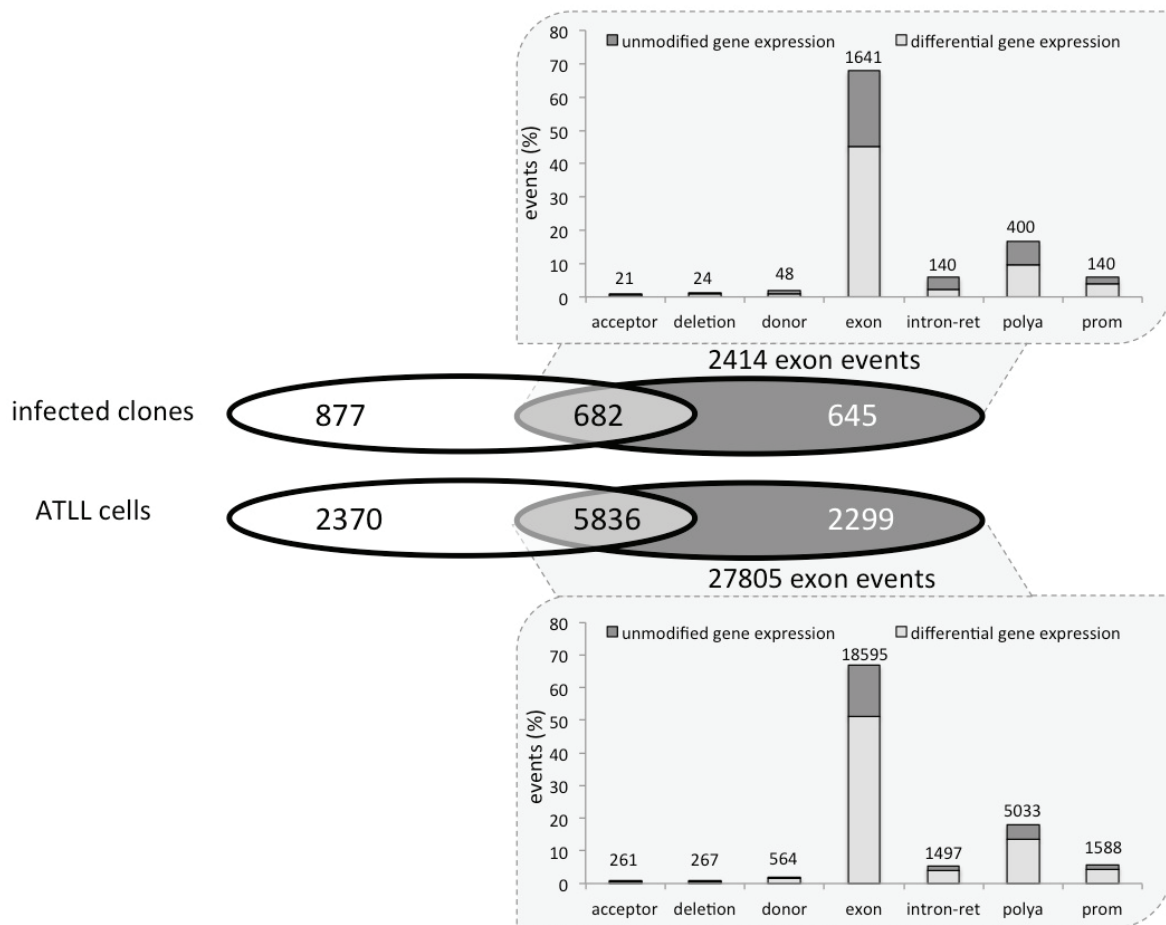
Les exons dérégulés dans les clones infectés et les ATLL ont été annotés manuellement avec la base de données FASTERDB (<https://fasterdb.lyon.unicancer.fr>). Les différents types d'évènements identifiés sont représentés dans les graphiques de la **figure 32** (acceptor : site d'épissage 3' alternatif ; deletion : délétion interne d'un exon ; donor : site d'épissage 5' alternatif ; exon : exon alternatif ; intron-ret : rétention d'un intron ; poly : site alternatif de polyadénylation ; prom : promoteur alternatif). Pour ce qui est des clones non transformés ou bien des ATLL, les 3 types d'évènements les plus représentés sont les cassettes exons, les sites alternatifs de polyadénylation et les promoteurs alternatifs.

Les résultats de puces exons ont été validés par PCR exon-spécifique pour ce qui concerne les dérégulations d'épissage alternatif (**FIGURE 33 et 34**). Au total, 18/20 (90%) évènements pris aléatoirement ont pu être validés par cette approche. Par exemple, on peut observer sur la **figure 34** une augmentation de l'expression du

transcrit avec l'exon 33 du gène CLASP1 dans les ATLL au détriment du transcrit sans cet exon.

Les dérégulations d'expression des gènes ont été validées par RT-PCR quantitative sur les clones infectés non transformés. La dérégulation d'expression de 8/9 (90%) gènes pris aléatoirement a été validée par cette approche (**FIGURE 35**).

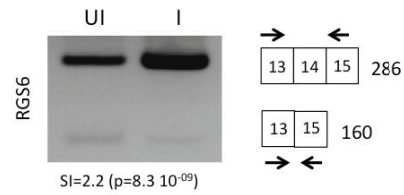
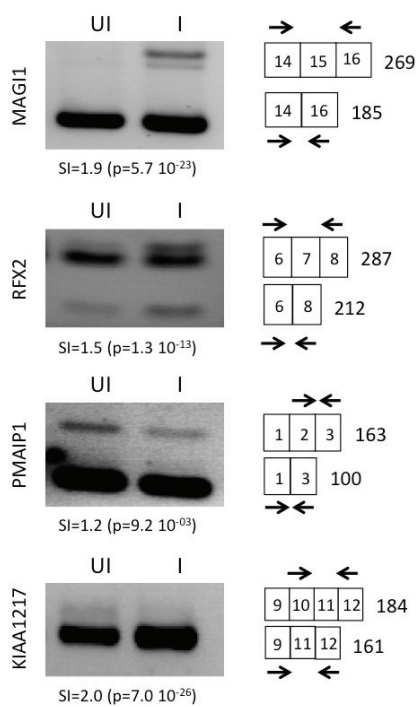




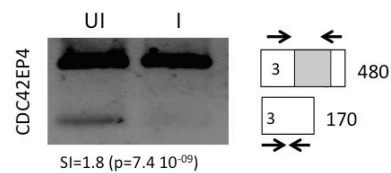
**Figure 32. Distribution des modifications d'expression d'exons entre les cellules ATLL et les clones T CD4+ issus de patients infectés par HTLV-1.**

Distribution des modifications quantitatives et qualitatives dans les clones T CD4+ infectés par HTLV-1 et les cellules d'ATLL en comparaison aux clones T CD4+ non infectés. Les diagrammes de Venn représentent le nombre de gènes dérégulés au niveau quantitatif (en blanc), qualitatif (en gris) ou bien les deux (en gris clair). En accord avec nos validations par RT-PCR et RT-PCR quantitatives, le seuil de significativité a été placé à 1,2 ( $p < 0,05$ ) pour l'expression globale du gène (fc : fold change) ainsi que pour l'indice d'épissage (SI : splicing index). Les graphiques représentent la distribution de chaque type d'événements d'exon alternatifs d'après la base de données FASTERDB. Acceptor : site accepteur d'épissage, deletion : délétion interne d'un exon, donor : site donneur d'épissage, exon : exon alternatif, intron-ret : rétention d'un intron, polya : site alternatif de polyadénylation, prom : promoteur alternatif.

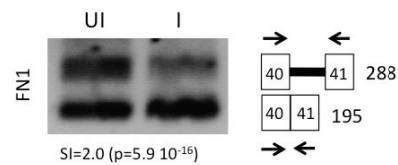
### Exon Skipping



### Internal Exon Deletion

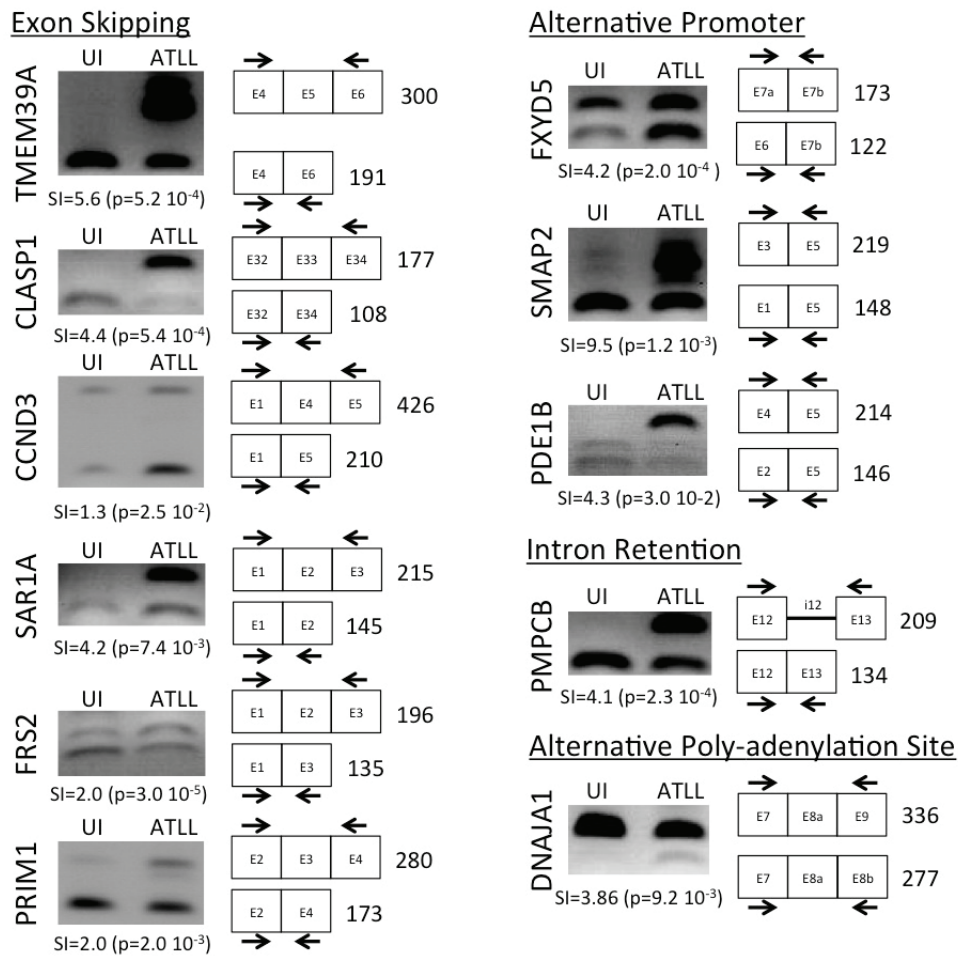


### Intron Retention



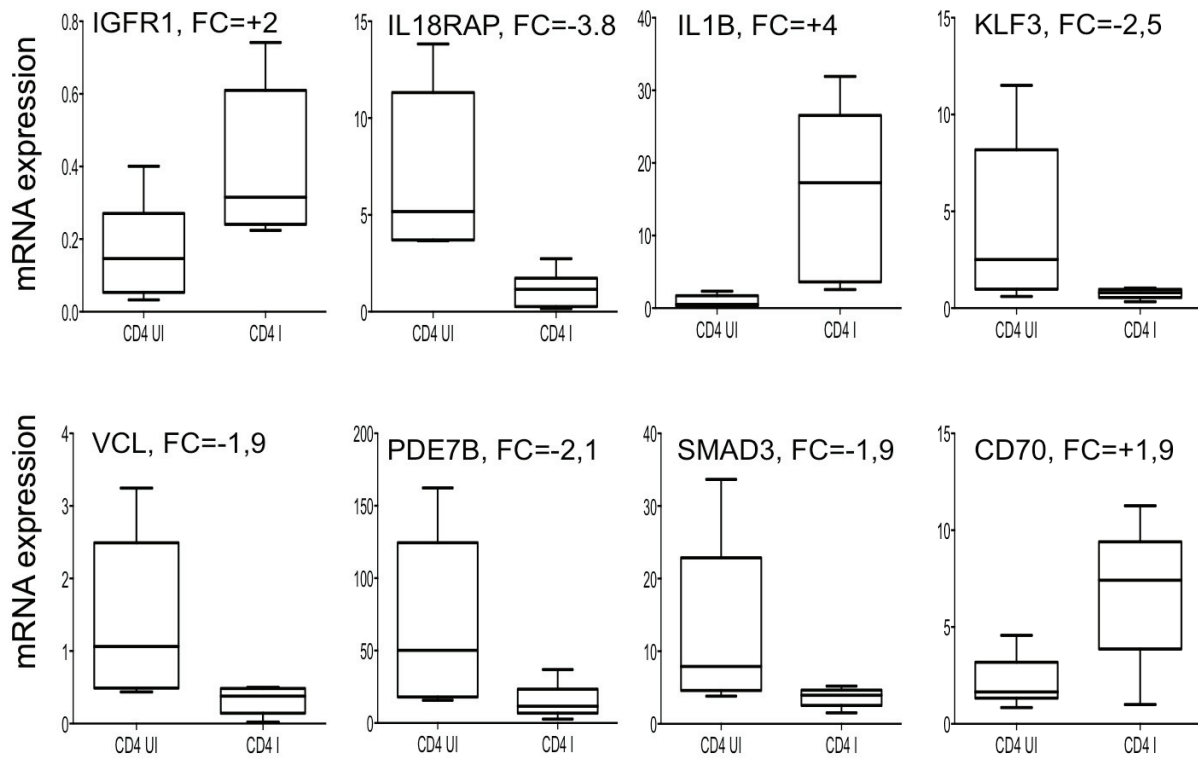
**Figure 33. Validations des événements d'épissage dans les clones T CD4+ infectés par HTLV-1.**

Les RT-PCR spécifiques d'exons ont été réalisées à partir du pool d'ARN des 6 clones non infectés *versus* les 6 clones infectés, reflétant ainsi les modifications d'épissage associées à l'infection par le HTLV-1, indépendamment de l'état d'activation de la cellule. Les données d'indice d'épissage (SI) ainsi que les p-value issues des analyses statistiques des puces exons sont indiquées pour chaque événement d'épissage. Les nombres indiquent les tailles attendues des produits de PCR. Les flèches représentent la position des amorces utilisées pour les amplifications.



**Figure 34. Validations des événements d'épissage dans les cellules ATLL.**

Les données d'indice d'épissage (SI) ainsi que les p-value issues des analyses statistiques des puces exons sont indiquées pour chaque événement d'épissage. Les nombres indiquent les tailles attendues des produits de PCR. Les flèches représentent la position des amorces utilisées pour les amplifications.



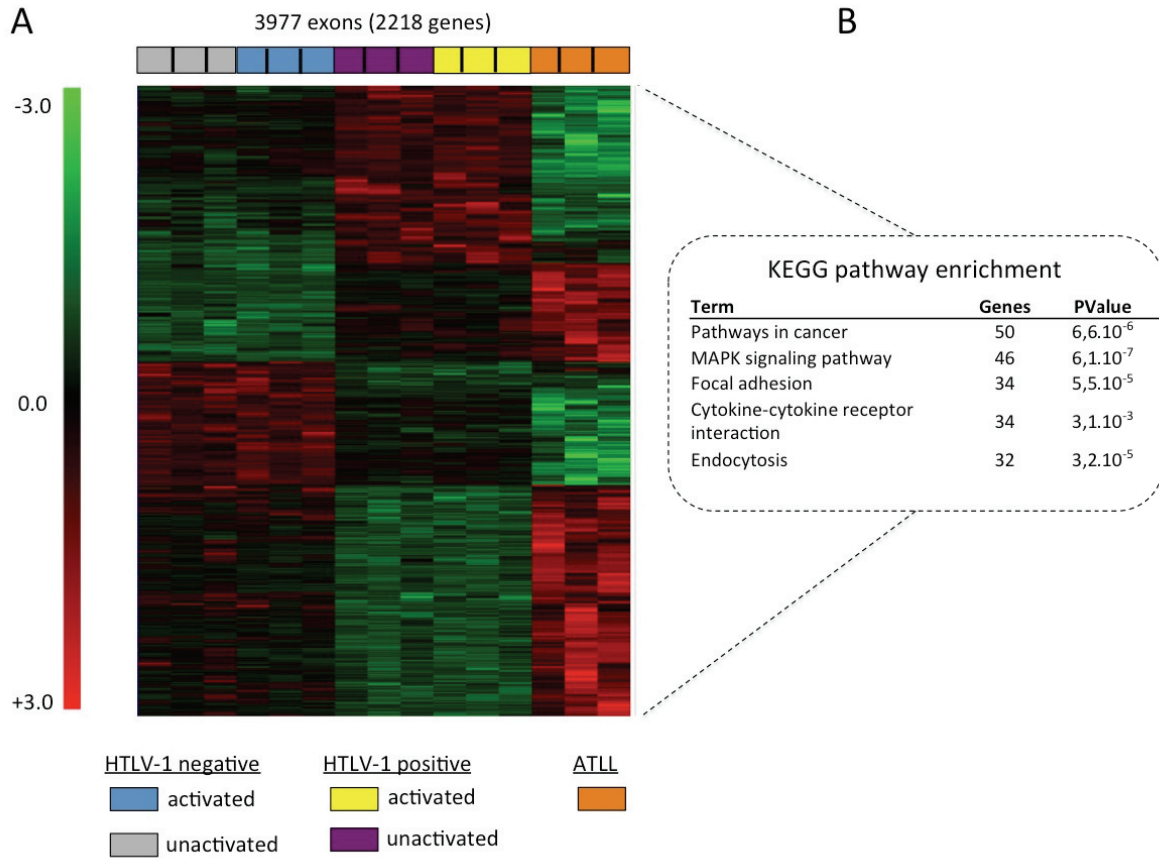
**Figure 35. Validations des dérégulations d'expression globale de gènes dans les clones T CD4+ infectés par HTLV-1.**

Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées en comparant les 6 clones T CD4+ non infectés (CD4 UI) et les 6 clones infectés (CD4 I). FC indique le différentiel d'expression du gène par l'analyse des puces exons.

## *B.2/ Les dérégulations d'expression d'exons alternatifs signent l'état d'infection et de transformation des cellules*

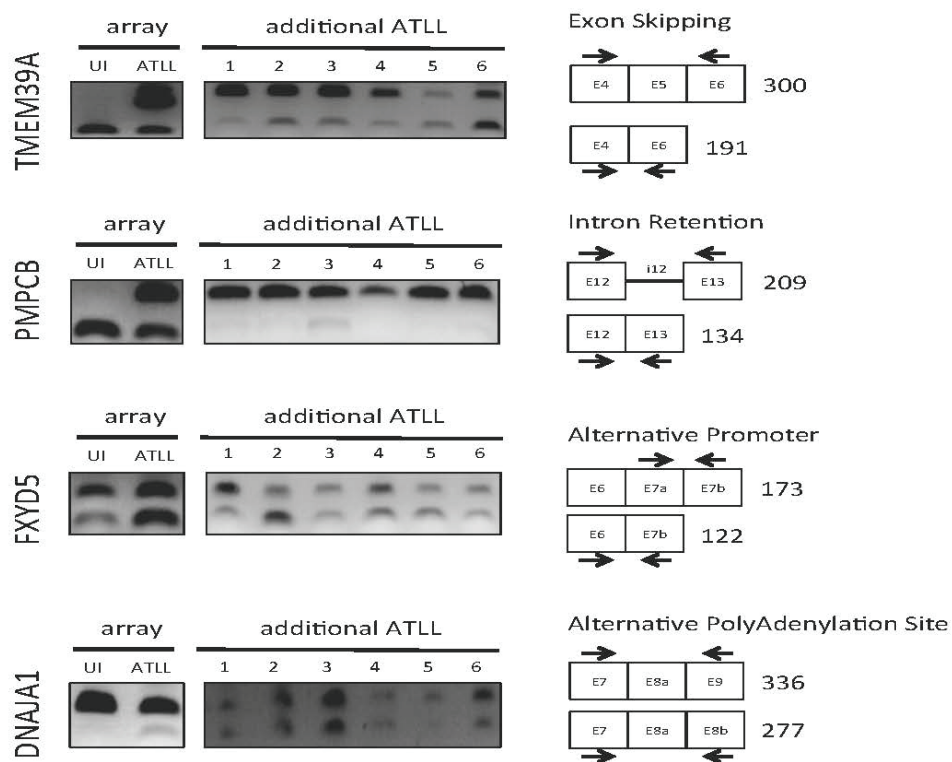
Dans le but de rechercher s'il pouvait exister une signature de l'infection et de la transformation à l'échelle de l'exon, les profils d'expression des exons ont été analysés par cluster hiérarchique en utilisant la plateforme Mev4.0. La sélection des exons présents sur la **figure 36A** a été basée sur un test statistique Kruskal Wallis ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Au total, l'expression de 3977 exons (correspondant à 2218 gènes) permettait de regrouper les échantillons en trois groupes, les clones non transformés non infectés, non transformés infectés et le groupe des ATLL (**FIGURE 36A**). Pour l'ensemble de ces exons sélectionnés, leur profil d'expression était indépendant de l'état de stimulation des clones par la PHA, appuyant ainsi le rôle de l'infection par HTLV-1 sur ces modifications d'expression d'exon.

Les cellules d'ATLL présentaient des profils d'expression d'exons distinct comparé aux clones non transformés, infectés ou non. Une telle distribution suggérait que certains événements d'épissage pourraient représenter une signature des ATLL. Les 11 événements déjà identifiés à la **figure 34** ont été testés sur 6 ATLL supplémentaires. Le profil d'expression de 4 événements distinguait effectivement les échantillons d'ATLL des cellules non infectées (**FIGURE 37**).



**Figure 36. Cluster hiérarchique des échantillons basé sur l'expression des exons.**

(A) Le cluster hiérarchique est basé sur l'expression des exons normalisée à l'expression globale du gène. La sélection des exons différenciant les 3 catégories d'échantillons est basée sur un test statistique ANOVA ( $p < 0,05$ ). (B) Analyse ontologique des gènes dérégulés qualitativement présents dans le cluster hiérarchique *via* le logiciel en ligne DAVID. Sont représentés les 5 plus forts KEGG pathway.



**Figure 37. Analyse par RT-PCR spécifique d'exons de 6 échantillons d'ATLL supplémentaires.**

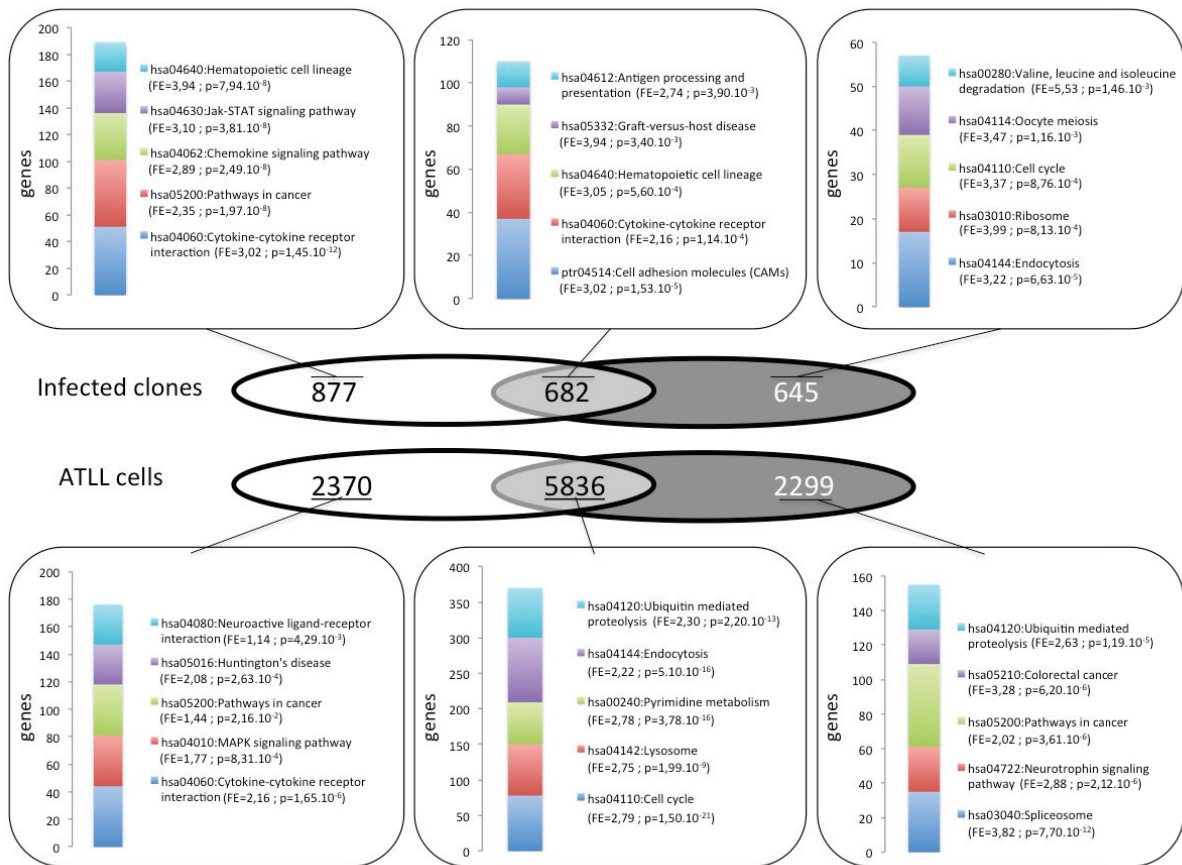
Les données d'indice d'épissage (SI) ainsi que les p-value issues des analyses statistiques des puces exons sont indiquées pour chaque événement d'épissage. Les nombres indiquent les tailles attendues des produits de PCR. Les flèches représentent la position des amorces utilisées pour les amplifications.

### B.3/ Signification biologique des dérégulations d'exons

Dans l'objectif de comprendre la signification fonctionnelle des gènes discriminant les 3 groupes d'échantillons mis en évidence dans la **figure 36A**, une étude ontologique des 2218 gènes a été réalisée *via* la base de donnée en ligne DAVID, en utilisant comme référence l'ensemble des gènes analysés par les puces exon spécifique. Le tableau de la **figure 36B** représente les 5 plus forts enrichissements en KEGG pathway. Les gènes étaient enrichis dans des processus biologiques importants, tels que le Cancer (50 gènes, fold enrichment (FE)=1,9 ;  $p=6,6.10^{-6}$ ), la voie de signalisation des MAPK (46 gènes, FE=2,2 ;  $p=6,1.10^{-7}$ ), les adhésions focales (34 gènes, FE=2,2 ;  $p=5,5.10^{-5}$ ), les interactions cytokines - récepteurs à cytokines (34 gènes, FE=1,7 ;  $p=3.10^{-3}$ ) et l'endocytose (32 gènes, FE=2,2 ;  $p=3,2.10^{-5}$ ) (**FIGURE 36B**).

L'analyse ontologique des gènes dérégulés quantitativement et qualitativement dans les ATLL et les clones infectés non transformés en comparaison aux clones non infectés a été réalisée (**FIGURE 38**). Les gènes dérégulés qualitativement ou quantitativement présentaient généralement des enrichissements dans des voies distinctes. Par exemple, dans les cellules non transformées, on observait un enrichissement de gènes impliqués dans le Cycle Cellulaire (FE=3,37,  $p=8,76.10^{-4}$ ) spécifiquement au niveau des dérégulations qualitatives. A l'inverse, les gènes dérégulés quantitativement étaient enrichis spécifiquement dans la voie de signalisation Jak-STAT (FE=3,10,  $p=3,81.10^{-8}$ ) et la voie de Signalisation des Chemokines (FE=2,89,  $p=2,49.10^{-8}$ ). Dans les cellules ATLL, on observait un enrichissement du terme "Spliceosome" (FE=3,82. $10^{-12}$ ) spécifiquement au niveau des gènes dérégulés qualitativement, ou bien encore Cycle Cellulaire ((FE=2,79,  $p=1,50.10^{-21}$ ) spécifiquement au niveau des gènes dérégulés à la fois en transcription et en épissage. Certains enrichissement étaient retrouvés à la fois au niveau des gènes dérégulés quantitativement et qualitativement, comme c'est le cas par exemple pour le terme "Pathway in Cancer" au niveau des ATLL ou bien encore "Hematopoietic Cell Lineage" pour les cellules non transformées (**FIGURE 38**).





**Figure 38. Etude ontologique des gènes dérégulés quantitativement et qualitativement dans les clones T CD4+ infectés ainsi que les ATLL.**

Les diagrammes de Venn représentent le nombre de gènes dérégulés au niveau quantitatif (en blanc), qualitatif (en gris) ou bien les deux (en gris clair). En accord avec nos validations par RT-PCR et RT-PCR quantitatives, le seuil de significativité a été placé à 1,2 ( $p < 0,05$ ) pour l'expression globale du gène (fc : fold change) ainsi que pour l'indice d'épissage (SI : splicing index). L'analyse ontologique des gènes dérégulés a été réalisée par le logiciel en ligne DAVID. Sont représentés les 5 plus forts KEGG pathway. FE= fold enrichment.

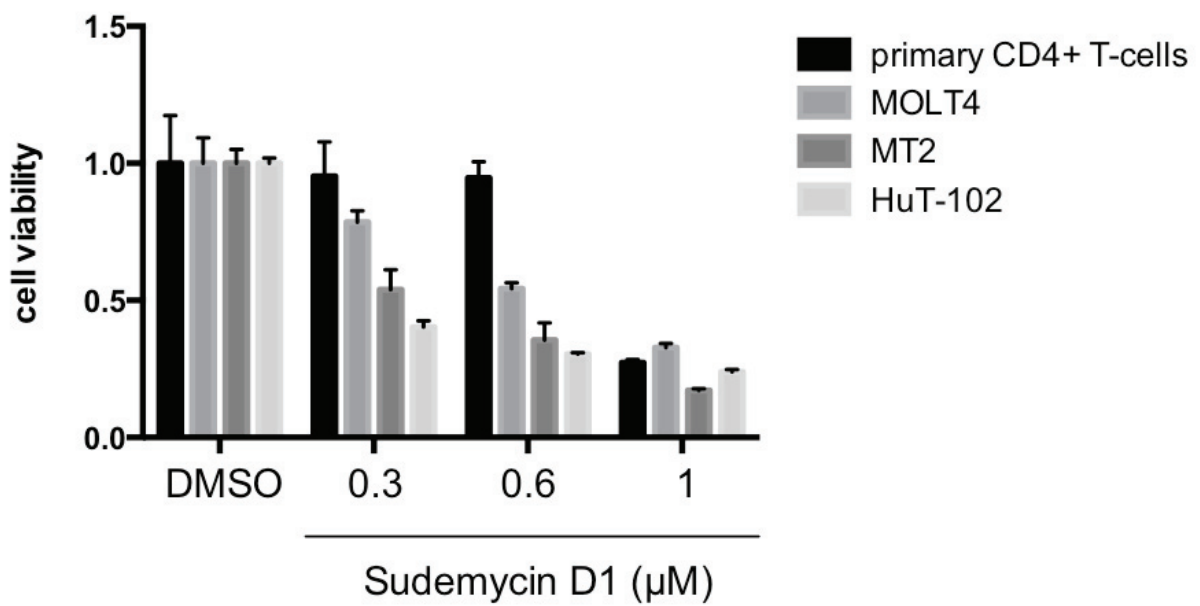
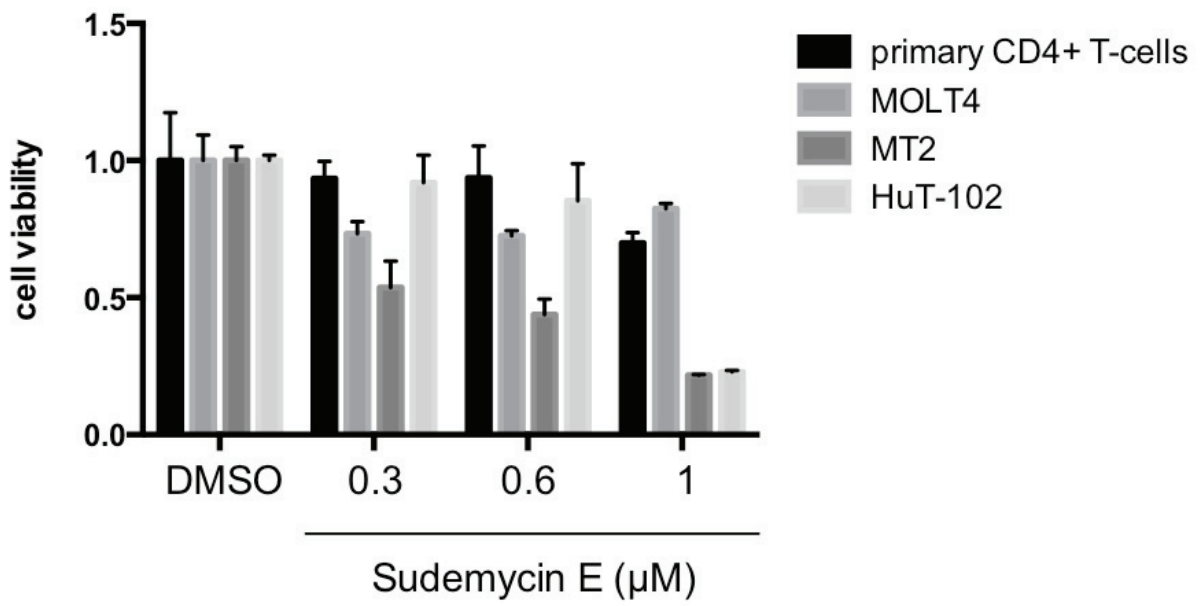
#### *B.4/ Effet antiprolifératif de la Sudemycin E sur les lignées cellulaires transformées HTLV-1 positives*

Le nombre important d'évènements d'épissage dans les ATLL suggérait que ces cellules pourraient être dépendantes d'une forte activité du spliceosome. Nous avons donc analysé si des inhibiteurs du spliceosome, les Sudemycin E et D1 (Fan et al. 2011), avaient un effet sur 2 lignées cellulaires transformées HTLV-1 positives : MT2 et HuT-102. Des cellules T CD4+ primaires ainsi que la lignée cellulaire transformée HTLV-1 négative MOLT4 ont été utilisées comme contrôle.

La viabilité des cellules après 72h d'exposition à une gamme croissante de Sudemycin E ou D1 a été analysée par des tests MTT (**Figure 39A**). En ce qui concerne la Sudemycin E, on peut observer que les cellules T CD4+ primaires ainsi que la lignée cellulaire MOLT4 présentent une légère diminution de leur viabilité avec l'augmentation de la concentration de la Sudemycin E. A l'inverse, la viabilité des lignées MT2 et HuT-102 étaient inhibée de moitié avec des concentrations respectives de l'ordre de 0,3 $\mu$ M et 1 $\mu$ M de Sudemycin E (**FIGURE 39A**). En ce qui concerne la Sudemycin D1, elle avait des effets cytologiques plus importants quel que soit le phénotype des cellules, infectées ou non (**FIGURE 39A**).

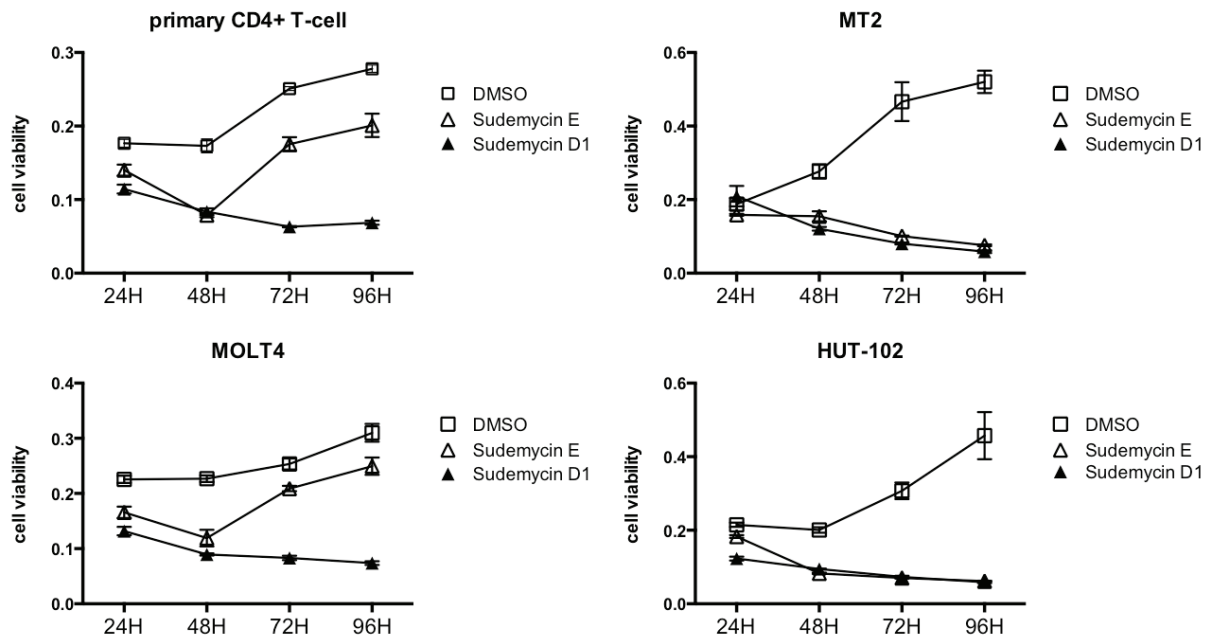
Les effets des Sudemycin E et D1 ont été par la suite étudiés dans le temps. La **figure 39B** représente les effets de 1  $\mu$ M de Sudemycin E et D1 sur une période de 96h. On observe que la Sudemycin D1 induit la mort de tous les types cellulaires. A l'inverse, les effets du traitement des cellules à 1 $\mu$ M de Sudemycin E sont variables en fonction du statut d'infection des cellules. Alors que l'on peut observer que la viabilité des 4 types cellulaires est diminuée dans les deux premiers jours de traitement à la drogue, on observait son augmentation après 48H de traitement pour les cellules T CD4+ primaires ainsi que la lignée MOLT4. A l'inverse, on peut observer que l'effet de la Sudemycin E sur les lignées infectées MT2 et HuT-102 était persistant (**FIGURE 39B**).

A



(Légende au dos)

**B**



**Figure 39. Effet de la sudemycin E sur les lignées infectées par HTLV-1.**

(A) La viabilité cellulaire a été déterminée par des tests MTT 72h après exposition à la Sudemycin E ou D1 aux concentrations indiquées. (B) Effets de l'exposition des cellules à 1 $\mu$ g de Sudemycin E ou D1 dans le temps. Les expériences ont été réalisées deux fois en triplicata pour chaque type cellulaire. Les données représentent les valeurs moyennes normalisées, avec les écart-types standard.

## C/ Discussion

Ces résultats décrivent pour la première fois les profils d'expression d'exons des cellules T CD4+ infectées par HTLV-1 *in vivo*. Nos données de classification hiérarchique des expressions d'exons révèlent un ensemble de 2218 gènes pour lesquels l'épissage alternatif apparaît spécifique du phénotype des cellules non-infectées, infectées non-transformées et des ATLL (**FIGURE 36**). L'infection par HTLV-1 induit des modifications d'expression d'exons dans des gènes dérégulés quantitativement mais également, pour la moitié d'entre elles, dans des gènes non modifiés quantitativement ( $fc < 1.2$ ). L'analyse ontologique des événements d'épissage révèle que ces gènes sont engagés dans des voies fonctionnelles tels que « cycle cellulaire » ou « cancer », qui font sens avec les effets cytopathogènes du virus. Aussi, en conservant les paramètres d'analyse des clones non-transformés, nous démontrons que les profils d'exons des ATLL portent 11 fois plus de modifications que leurs contreparties non-tumorales, en comparaison aux clones T CD4+ non infectés utilisés contrôles. Nous avons par ailleurs montré que 4 événements d'épissage étaient récurrents dans 6 ATLL supplémentaires. Ces données suggèrent une dérégulation de la machinerie d'épissage dans les cellules infectées et transformées par HTLV-1. Conformément à cette hypothèse, les cellules de lignées transformées par HTLV-1 présentaient une sensibilité accrue aux effets de la drogue du spliceosome Sudemycin E, comparée aux cellules T-CD4+ primaires et aux cellules immortalisées non-infectées MOLT4.

Nos analyses transcriptomiques des clones T CD4+ issus d'individus naturellement infectés par HTLV-1 mettent à jour une reprogrammation complexe du transcriptome des cellules hôtes incluant des modifications quantitatives, qualitatives ou encore la combinaison des deux. De façon intéressante, l'ontologie de ces gènes montre que ces différents modes de régulations affectent chacune des voies fonctionnelles distinctes, suggérant que l'altération des processus d'épissage pourrait constituer une nouvelle stratégie pour HTLV-1 dans le contrôle de l'expression des gènes de ses cellules hôtes. L'importance des dérégulations d'épissage alternatif a été jusqu'ici globalement ignorée par les études des relations du HTLV-1 avec sa cellule hôte, qui se sont focalisées uniquement sur les dérégulations quantitatives de l'expression des gènes (Pise-Masison et al. 2002; Koga et al. 2004; Tsukasaki et al. 2004; Fung et al. 2005; Sasaki et al. 2005;

Oliere et al. 2010; Watanabe et al. 2010; Kress et al. 2011; Chevalier et al. 2012). Nos résultats démontrent ici clairement qu'outre les aspects quantitatifs des dérégulations géniques, l'infection par HTLV-1 s'accompagne aussi de modifications qualitatives de nombreux transcrits cellulaires qu'il reste aujourd'hui à caractériser au niveau fonctionnel. Ces données ouvrent de nouvelles voies d'investigations et augmentent notre niveau de compréhension des mécanismes qui sous-tendent la persistance de l'infection et la transformation maligne associée au HTLV-1.

La régulation de l'épissage alternatif est un processus clé dans la différenciation cellulaire, ainsi que dans l'ensemble des mécanismes qui gouvernent la survie et la mort cellulaire. L'altération de l'expression d'exons a aussi été étroitement liée aux pathologies humaines, telles que les cancers (Cooper et al. 2009; Kalsotra and Cooper 2011). Le métabolisme et les capacités métastatiques des cellules cancéreuses ont été étroitement liés à des événements d'épissage alternatif (Kaida et al. 2012). Par exemple, les cellules infectées par HTLV-1, sous les effets de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax, expriment préférentiellement l'isoforme d'épissage BCL-XL aux propriétés anti-apoptotique au détriment de la forme courte BCL-XS pro-apoptotique (Tsukahara et al. 1999; Nicot et al. 2000a; Mori et al. 2001). Les annotations manuelles des profils d'expression d'exons des cellules infectées par HTLV-1 indiquent ici que l'événement d'exon le plus représenté est la cassette exon, correspondant à l'inclusion ou l'exclusion de l'exon alternatif dans l'ARN messager final. Ce type d'évènement peut conduire à la production d'isoforme protéique ayant des rôles différents voire antagonistes. En effet, l'expression alternative d'un exon du gène TNFRSF6 induit la production de 2 isoformes du récepteur FAS, ayant des activités antagonistes : l'isoforme membranaire impliquée dans la transduction des signaux pro-apoptotique, et l'isoforme soluble qui protège de la mort cellulaire (Cheng et al. 1994). De manière similaire, le stress cellulaire influence l'épissage alternatif du gène MDM2, générant un grand nombre d'isoforme présentant une activité antagoniste de p53 réduite. Ces dérégulations d'épissage de MDM2 aboutissent à l'induction de la mort cellulaire par la perte de la régulation négative de p53 par MDM2 (Jeyaraj et al. 2009; Dutertre et al. 2010). Dans notre étude, notre approche par RT-PCR nous a permis de valider des modifications d'expression de cassette exon sur différents gènes au niveau des cellules infectées par HTLV-1, transformées ou non. Certaines d'entre elles pourrait être responsables de modifications

de structure de l'ARN messenger de PMPCB, DNA primase 1, cyclin D3, NOXA/PMAIP1, CLASP1, interférant potentiellement dans la régulation de l'activité mitochondriale, de la réplication de l'ADN, du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la ségrégation des chromosomes, , respectivement (Maiato et al. 2003; Kozar and Sicinski 2005; Ploner et al. 2008; Luczynski et al. 2009; Patel et al. 2011).

Le nombre important de modifications d'épissage alternatif dans les cellules infectées par HTLV-1 suggère que l'infection pourrait détourner l'activité du spliceosome. Nos données montrent que les lignées cellulaires infectées MT2 et HuT-102 présentent une sensibilité accrue aux effets de l'inhibiteur du spliceosome Sudemycin E comparé aux cellules T CD4+ primaires non-infectées. Ces données sont en adéquation avec les travaux de Fan *et al.* qui démontraient une meilleure efficacité des drogues dans l'altération des épissages alternatifs des cellules tumorales par rapport à leurs contrepartie non-tranformées (Fan et al. 2011). De façon intéressante, nos données montrent que l'utilisation à faible dose de la Sudemycin E permet d'induire une mortalité des lignées HUT102 et MT-2 alors que les cellules MOLT4 transformées et non-infectées restaient insensibles. Ces résultats suggèrent que les cellules tumorales HTLV-1 puissent être plus sensibles que d'autres tumeurs aux drogues d'épissage.

En conclusion, nous démontrons dans ce travail que des altérations de l'épissage alternatif accompagnent l'expansion clonale des cellules T CD4+ infectées par HTLV-1 *in vivo*. Ces réarrangements qualitatifs culminent au stade tumoral de l'infection et définissent un nouveau mécanisme de contrôle de l'expression des gènes cellulaires par HTLV-1. Les travaux futurs, notamment à travers la dissection des mécanismes moléculaires qui relie HTLV-1 à l'épissage cellulaire, permettront de mieux comprendre le rôle de ces modifications qualitatives de l'expression des gènes cellulaires, dans la physiopathologie de l'infection.

2/ PARTIE 2 : L'activation de la voie NF-kB par la protéine Tax du HTLV-1 induit l'expression du variant d'épissage CD44v10 *via* un enrichissement de l'ARN polymérase II.



## A/ Introduction

La voie NF- $\kappa$ B est constitutivement activée dans les cellules infectées par HTLV-1. L'oncoprotéine virale Tax a été identifiée comme un acteur majeur de son hyperactivation et en conséquence de la transcription d'un grand nombre des gènes cibles participant au contrôle de la réponse inflammatoire et de l'expansion clonale des cellules infectées (Lacoste et al. 1995; Mori et al. 1999; Currer et al. 2012; Shirinian et al. 2013). Par l'utilisation de mutant de Tax, il a été montré que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est indispensable pour l'immortalisation de lymphocyte T humain par Tax (Robek and Ratner 1999). Le mutant Tax M22 porteur des mutations T130A et L131S est incapable d'interagir avec le IKK $\gamma$  et perd sa capacité à activer la voie NF- $\kappa$ B. Contrairement à sa contrepartie sauvage, Tax M22 a été montrée comme incapable d'inhiber les fonctions transcriptionnelles de p53 (Pise-Masison et al. 2000) et ne permet pas l'activation du promoteur BCL-X et la surexpression de l'isoforme BCL-XL (Tsukahara et al. 1999). Chez l'animal, l'infection expérimentale par des clones infectieux exprimant un mutant de Tax déficient pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ne permet pas la transformation maligne des cellules T. L'ensemble de ces données souligne l'importance de NF- $\kappa$ B dans les processus oncogènes liés à HTLV-1. L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules ATLL permet d'induire l'apoptose, ce qui définit également la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B comme une cible thérapeutique d'intérêt (Mori, 1999 et 2002). Bien que les effets de l'activation de NF- $\kappa$ B aient été largement décrits au niveau transcriptionnel, leurs impacts sur les événements d'épissage alternatif dans les processus d'oncogenèse sont peu abordés.

Par des approches d'immunoprécipitation de la chromatine spécifique de RelA et de séquençage haut débit de l'ADN de cellules HeLa exposées au TNF $\alpha$ , il a été montré que, outre sa distribution au niveau de promoteurs cellulaires, la protéine p65/RelA pouvait également être retrouvée enrichie au niveau de régions intragéniques et préférentiellement au niveau de séquences introniques (Xing et al. 2013). Ces données suggèrent que p65/RelA puisse avoir d'autres fonctions que celles décrites aujourd'hui dans les phases d'initiation de la transcription. Dans ce contexte, sans aborder précisément son mécanisme d'action, l'exposition au TNF $\alpha$  (Facteur de nécrose tumorale, un activateur de la voie NF- $\kappa$ B) des cellules de carcinome colorectal permet d'induire l'épissage alternatif du gène CD44 et d'influencer l'adhésion cellulaire

(Barshishat et al. 2002). Ces résultats proposent que l'activation de la voie NF-kB pourrait participer aux processus de régulation qualitatif des gènes.

L'ensemble de ces données nous a amené à rechercher si, outre ses effets quantitatifs sur l'expression des gènes, l'activation de la voie NF-kB par Tax pouvait également s'accompagner de réarrangements à l'échelle de l'exon. Pour ce faire, nous avons étudié à l'échelle cellulaire les effets de Tax et du mutant Tax M22 sur les profils d'expression d'exon. Nos données montrent que Tax promeut une dérégulation qualitative des ARN cellulaires en partie dépendante de l'activation de la voie NF-kB. En particulier, nos travaux montrent que Tax induit l'expression de l'isoforme d'épissage CD44v10 de manière NF-kB dépendante, à travers le recrutement de l'ARN polymérase II.

## B/ Résultats

### *B.1/ Dérégulation de l'épissage alternatif cellulaire via l'activation de la voie NF-kB par Tax*

Afin d'analyser les effets sur l'épissage alternatif, de l'activation de la voie NF-kB par Tax, des cellules HEK293T LTR-GFP ont été transitoirement transfectées par le plasmide contrôle (psg5-vide), le plasmide d'expression de la protéine Tax sauvage (psg5-Tax WT) ou un mutant de Tax incapable d'activer la voie NF-kB (psg5-Tax M22). L'efficacité de transfection a été vérifiée par cytométrie en flux pour l'expression de la GFP sous le contrôle du LTR du HTLV-1. Les efficacités de transfections étaient supérieures à 75% et étaient identiques entre les vecteurs Tax WT et Tax M22 (données non montrées). Les profils d'expression des exons des ARN totaux provenant de 3 transfections indépendantes ont été analysés par puces exons spécifiques (Affymetrix), 48h après transfection. Les données de puces ont été comparées entre les cellules exprimant Tax et les cellules contrôles (psg5-vide) selon la méthode de l'index d'épissage (SI, pour splicing index), qui est basée sur la normalisation de l'intensité du signal de l'exon d'intérêt avec la médiane d'expression de la totalité des exons du gène d'intérêt. Cette approche permet de tenir compte du niveau global de l'expression du gène. Les changements d'expression du gène (FC, pour fold change) ont été considérés significatifs lorsqu'ils atteignaient la valeur de 1,2 avec une p-value  $p \leq 0,05$ . Le seuil de significativité de SI a été fixé à 1,45 avec  $p \leq 0,05$  en accord avec nos validations par RT-PCR.

La **figure 40A** exprime le nombre de gènes modifiés quantitativement (en blanc), qualitativement (en gris foncé), ou les deux (en gris claire). Dans les cellules transfectées transitoirement avec le psg5-Tax WT, 2687 gènes étaient altérés quantitativement, 856 gènes qualitativement (1041 évènements), et 308 gènes étaient altérés à la fois quantitativement et qualitativement (439 évènements). En comparaison, dans les cellules transfectées avec Tax M22, 595 gènes étaient altérés quantitativement, 328 gènes qualitativement (341 évènements), et 26 gènes à la fois quantitativement et qualitativement (29 évènements) (**FIGURE 40A**).

Ces données indiquent que la perte de la capacité à activer la voie NF-kB par Tax se traduit par une diminution de 4,8 fois du nombre de gènes dérégulés quantitativement (2995 vs 621 gènes) (**FIGURE 40A**). Ces données sont en accord avec les travaux précédant montrant l'importance de l'activation de la voie NF-kB dans les mécanismes de dérégulation transcriptionnelle médiés par Tax (Ng et al. 2001).

Par ailleurs, au niveau des dérégulations qualitatives, on a observé une diminution d'un facteur de 3,2 du nombre de gènes dérégulés dans leur épissage, suggérant l'implication de l'activation de la voie NF-kB dans la régulation de l'épissage alternatif. Cependant, l'expression du Tax M22 était aussi associée à la dérégulation d'épissage alternatif de 354 gènes, indiquant que Tax est capable de moduler l'épissage alternatif de façon indépendante à l'activation de la voie NF-kB. Enfin, on observe une diminution de plus de 11 fois du nombre de gènes dérégulés à la fois quantitativement et qualitativement entre les cellules Tax WT comparées aux contrôles, et les cellules Tax M22 comparées aux contrôles (308 vs 26). En d'autres termes, 26% (308/1164) des gènes dérégulés qualitativement étaient aussi dérégulés quantitativement dans les cellules Tax WT, alors que ce chiffre n'était que de 7% (26/354) dans les cellules Tax M22. Ces données indiquent que l'activation de la voie NF-kB induit un nombre important de modifications qualitatives de gènes modifiés quantitativement, mais également des gènes n'étant pas quantitativement modifiés entre les conditions Tax positives et contrôles.

Les événements d'épissage alternatif ont été visualisés et annotés manuellement à l'aide des sites ELEXIR et FASTERDB développés par l'équipe de Didier Auboeuf au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL). Dans les cellules exprimant Tax WT ou Tax M22, les proportions de chaque type d'évènement d'épissage alternatif étaient semblables. La majorité des évènements observés étaient des cassettes exons (environ 60% des évènements). En deuxième position, les sites de polyadénylation alternatifs représentaient environ 10% des évènements observés (**FIGURE 40B**). Ces différences semblent cependant plus représentatives de la description de ces évènements dans les banques de données plutôt que des effets de Tax.

A

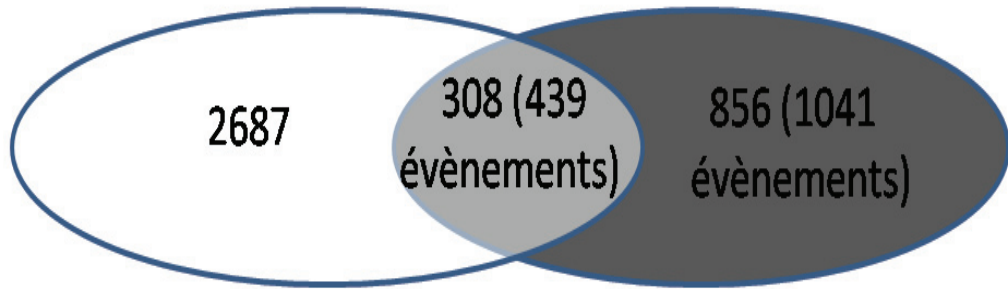


Transcription (FC  $\geq 1.2$ )

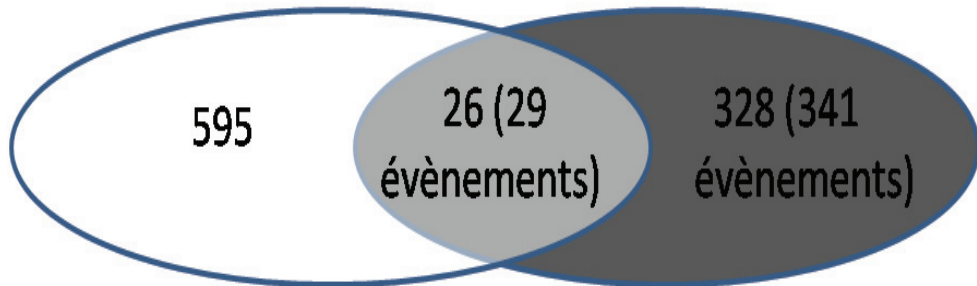


Epissage alternatif (SI  $\geq 1.45$ )

Tax WT



Tax M22



(Légende au dos)

B

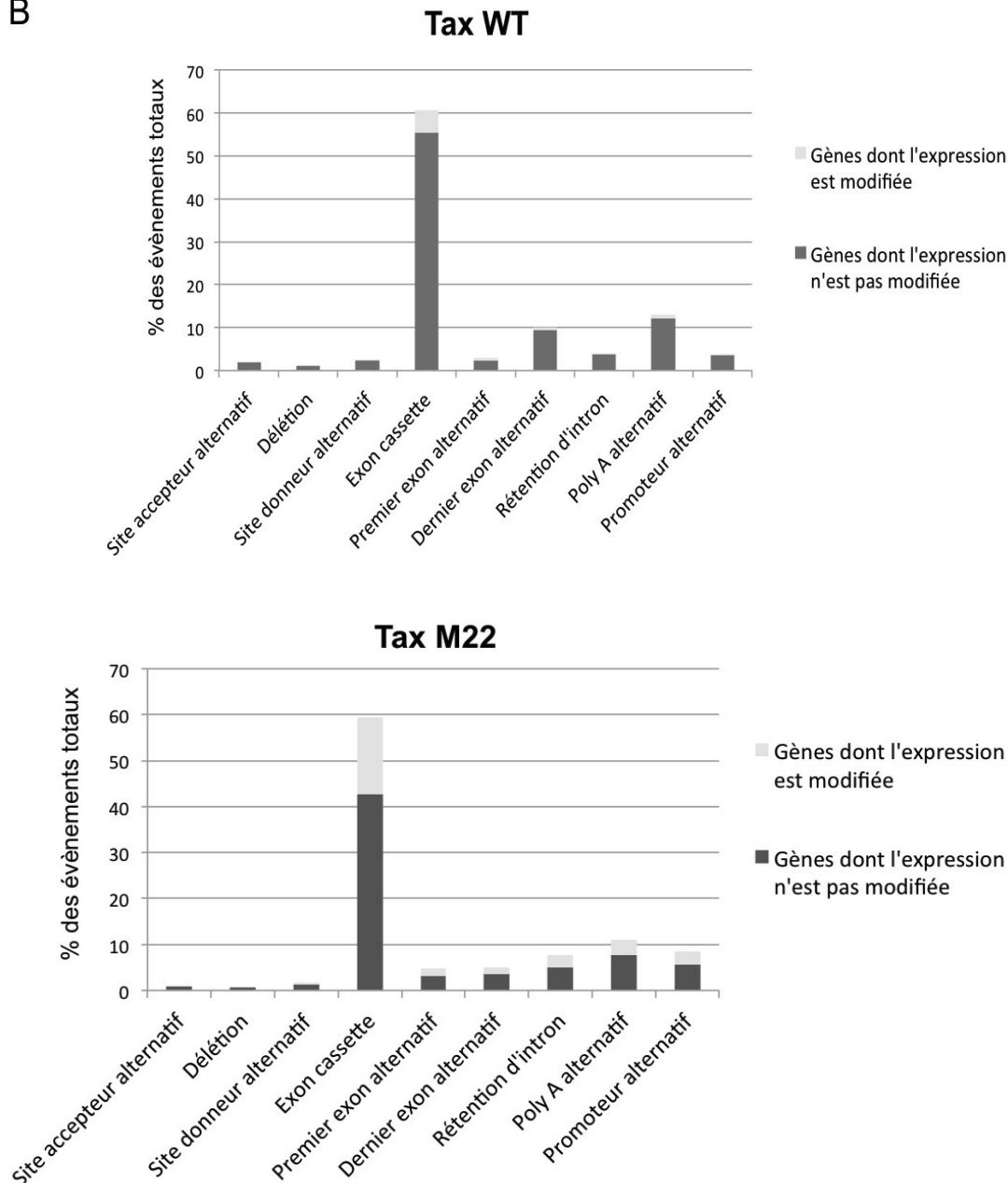


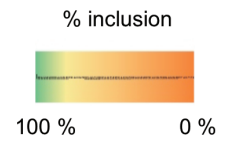
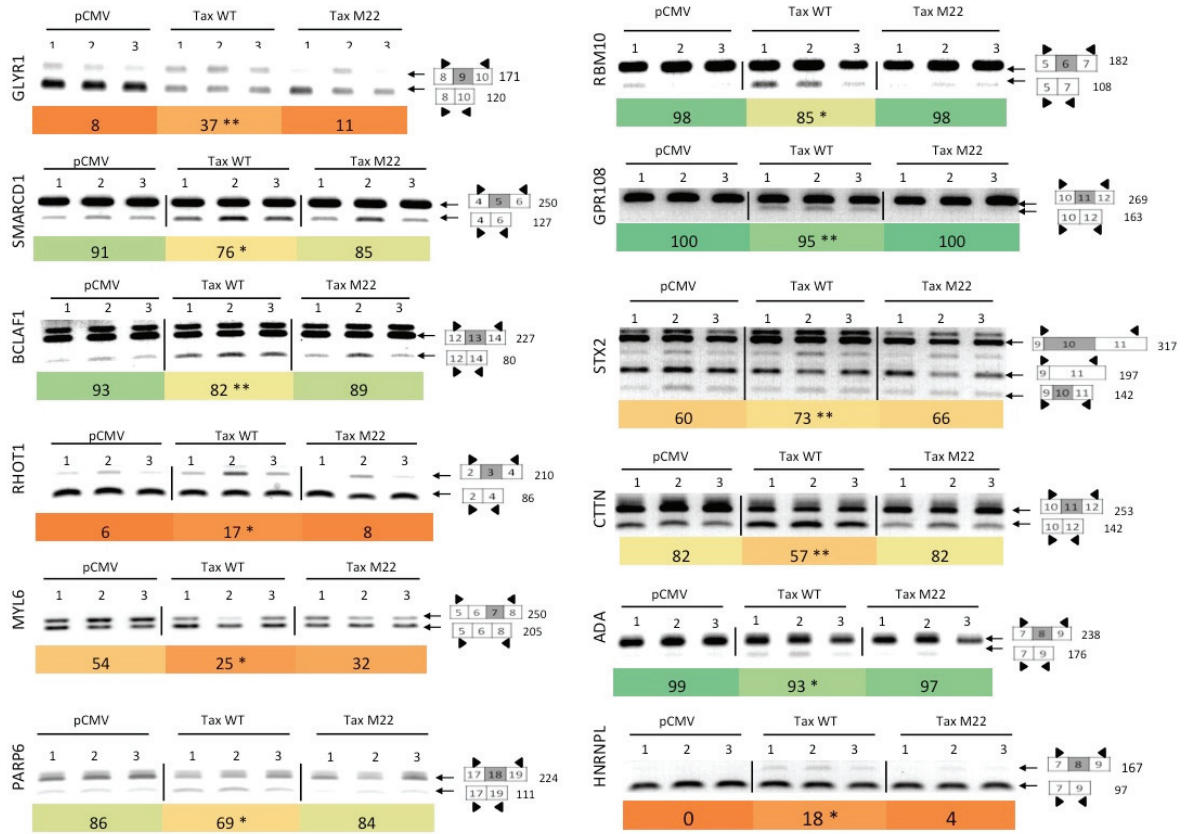
Figure 40. Distribution des modifications d'expression d'exons dans les cellules HEK293T LTR-GFP exprimant Tax WT ou Tax M22.

(A) Distribution des modifications quantitatives et qualitatives des gènes cellulaires dans les cellules exprimant Tax WT ou Tax M22 en comparaison au contrôle psg5-vide. Les diagrammes de Venn représentent le nombre de gènes dérégulés au niveau quantitatif (en blanc), qualitatif (en gris) ou bien les deux (en gris clair). En accord avec nos validations par RT-PCR et RT-PCR quantitatives, le seuil de significativité a été placé à 1,2 ( $p < 0,05$ ) pour l'expression globale du gène (fc : fold change) et à 1,45 pour l'indice d'épissage (SI : splicing index). (B) Les graphiques représentent la distribution de chaque type d'événements d'exon alternatifs d'après la base de données FASTERDB.

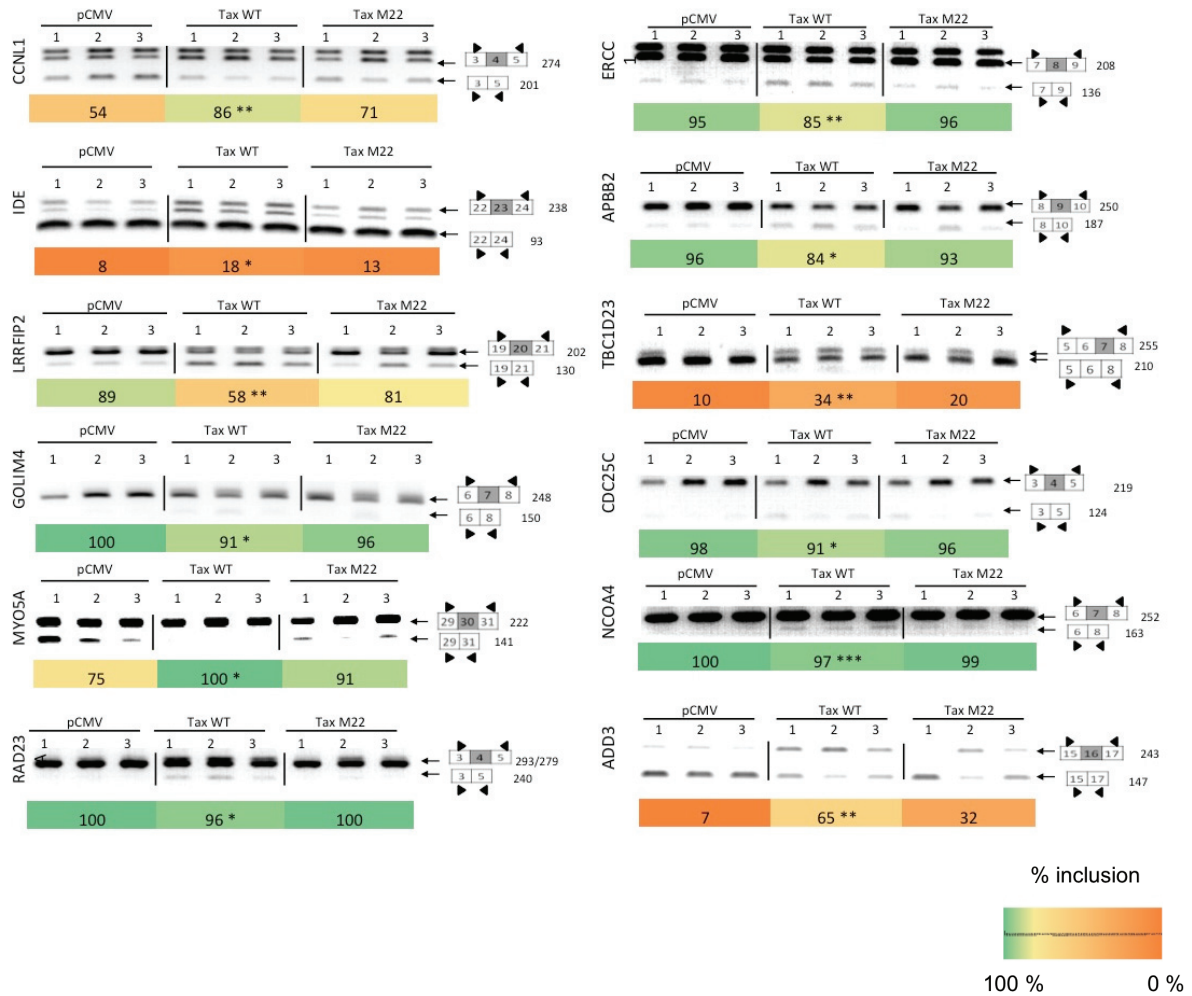
Les données des puces ont été validées par RT-PCR spécifiques d'exons. Au total, les analyses par RT-PCR de 24/30 (80%) événements d'exon cassette sélectionnés aléatoirement étaient retrouvés significatifs et identiques aux données de puces (**FIGURE 41**). Par exemple, l'inclusion de l'exon 9 du gène GLYR1 ou encore l'exclusion de l'exon 6 de RBM10 sous l'effet de Tax ont pu être validés par cette approche. Certains des événements d'épissage étaient partagés entre les cellules exprimant Tax WT et Tax M22, suggérant que ces modifications d'épissage étaient indépendantes de l'activation de NF-kB. Parmi elles, l'expression de l'isoforme portant l'exon 7 du gène TBC1D23 était retrouvée augmentée dans les cellules exprimant Tax WT et Tax M22, alors que l'augmentation de l'expression de l'isoforme MYO5A portant l'exon 30 était uniquement retrouvée dans les cellules exprimant Tax WT (**FIGURE 41**).

Une analyse ontologique des gènes modifiés en épissage a été réalisée avec la base de donnée DAVID en utilisant pour référence les gènes explorés par les puces exons (**FIGURE 42**). La **figure 42** présente les Top 5 des voies fonctionnelles (KEGG pathway) enrichies par les gènes subissant des changements quantitatifs (en blanc), qualitatifs (en gris foncé) ou les deux (en gris clair). De façon intéressante, les gènes dérégulés qualitativement étaient le plus souvent engagés dans des voies biologiques distinctes de ceux modifiés au niveau quantitatif. Par exemple, la voie "Pathway in Cancer" apparaissait portée que par les gènes modifiés en épissage dans les conditions Tax WT et Tax M22 (**Figure 42**). Les voies "MAPK signaling" et "Focal adhesion" apparaissait quant à elles portées par des gènes subissant des modifications quantitatives ou qualitatives. Vraisemblablement expliqué par le faible nombre de gènes, l'analyse d'ontologie des gènes modifiés quantitativement et qualitativement dans les cellules Tax M22 était infructueuse (**FIGURE 42**).

L'ensemble de ces données met en évidence, qu'en parallèle de son effet sur la régulation quantitative de l'expression des gènes cellulaires, l'activation de la voie NF-kB par Tax induit des modifications qualitatives des transcrits cellulaires impliqués dans des voies de signalisation (MAPK et Cancer) de la prolifération et l'immortalisation cellulaire.

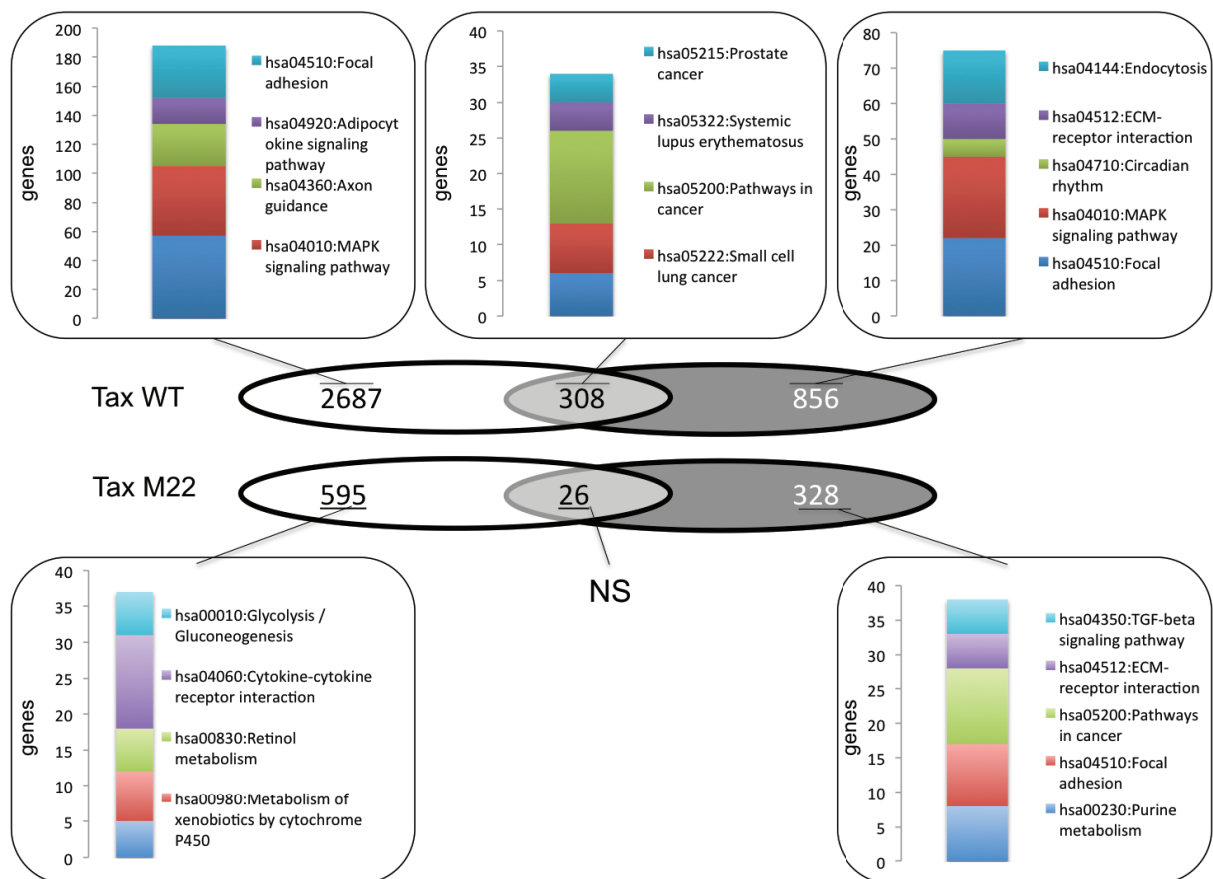






**Figure 41. Validation des événements d'épissage dans les cellules exprimant Tax WT et Tax M22.**

Les RT-PCR spécifiques d'exons ont été réalisées à partir des échantillons d'ARN utilisés pour les puces exons. Les nombres indiquent les tailles attendues des produits de PCR. Les flèches représentent la position des amorces utilisées pour les amplifications. En dessous des gels sont indiquées les valeurs moyennes du taux d'inclusion d'exon (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figure 42. Analyse ontologique des gènes dérégulés en transcription et en épissage dans les cellules exprimant Tax WT et Tax M22.**

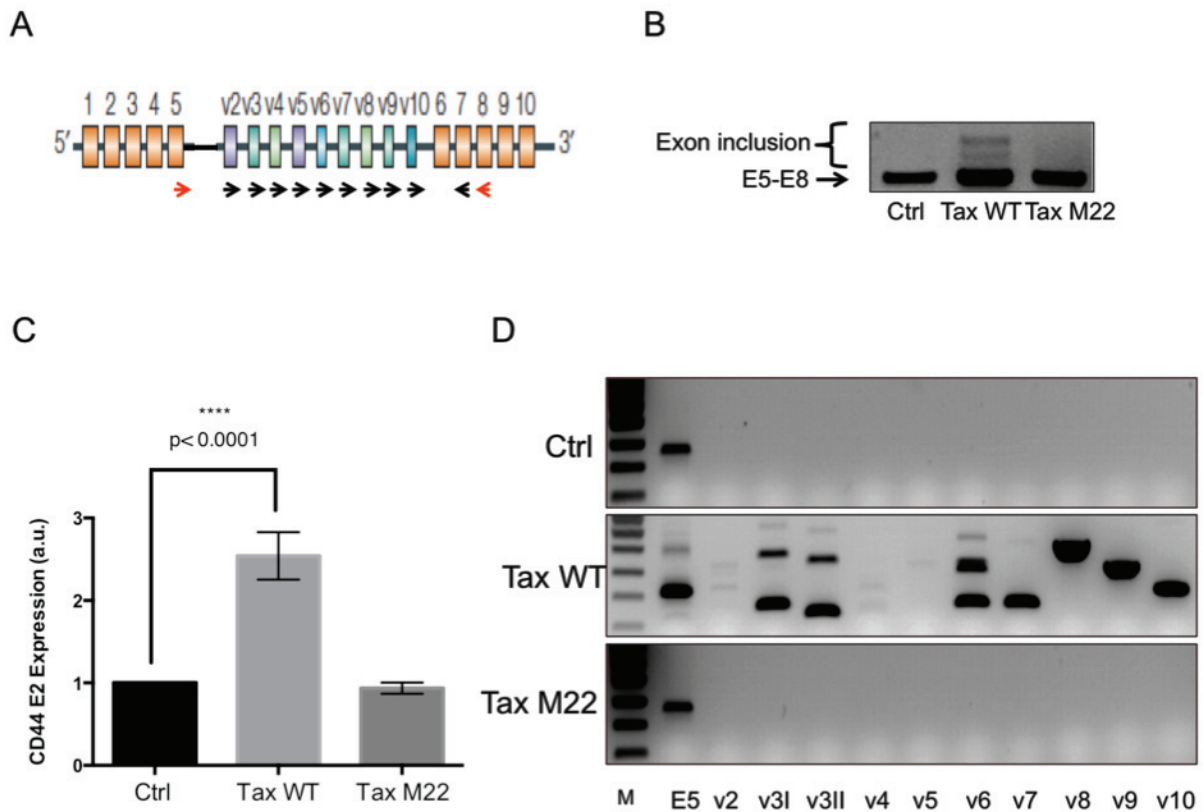
Les diagrammes de Venn représentent le nombre de gènes dérégulés quantitativement (en blanc), qualitativement (en gris) ou bien les deux (en gris clair). En accord avec nos validations par RT-PCR et RT-PCR quantitatives, le seuil de significativité a été placé à 1,2 ( $p < 0,05$ ) pour l'expression globale du gène (fc : fold change) et 1,45 pour l'indice d'épissage (SI : splicing index). L'analyse ontologique des gènes dérégulés a été réalisée par le logiciel en ligne DAVID. Sont représentés les 5 plus fort KEGG pathway. NS : non significatif.

## B.2/ Régulation de l'expression de CD44 par Tax

Parmi les gènes modifiés de façon NF-kB- dépendante dans leur épissage et leur niveau d'expression dans les cellules Tax positives, le gène CD44 a été choisi pour aborder les mécanismes moléculaires qui relient Tax et l'épissage alternatif. CD44 code une glycoprotéine membranaire impliquée dans les interactions cellule-cellule, l'adhésion et la migration cellulaire. Elle est notamment impliquée dans l'activation lymphocytaire et le homing. Ce gène présente 9 exons variables (v2-v10), situés entre les exons constants 5 et 8 (**FIGURE 43A**). Certaines isoformes d'épissage de CD44, tels que l'isoforme CD44v6, ont été associées aux mécanismes de métastase (**FIGURE 43A**) (Pals et al. 1993; Sleeman et al. 1995; Negi et al. 2012; Williams et al. 2013). L'épissage alternatif de CD44 a été largement étudié mettant à disposition de nombreux outils moléculaires.

Les données de puces exons ont été validées par de nouvelles transfections transitoires des cellules HEK293T avec les vecteurs d'expression psg5-vide, psg5-Tax WT ou psg5-Tax M22. Les ARN totaux ont été extraits à 48 heures post-transfection. L'expression du gène CD44 a été contrôlée par RT-PCR avec les oligonucléotides situés sur les exons constants 5 et 8 (**FIGURE 43A**). La **figure 43B** montre que le signal correspondant au fragment de PCR de la jonction exon 5 et exon 8 est plus intense dans les cellules exprimant Tax WT que dans les cellules contrôles ou Tax M22, confirmant l'effet positif de Tax sur l'expression globale du gène CD44 (Zhang et al. 2011). De plus, dans la condition Tax WT, des bandes additionnelles étaient présentes, indiquant l'inclusion d'exons variables. Ces bandes additionnelles n'étaient pas observées dans les conditions contrôle et Tax M22, ce qui suggérait un effet dépendant de l'activation de la voie NF-kB. Ces données ont été validées par RT-PCR quantitative ciblant l'exon constant 2 du CD44, considéré comme un témoin du niveau d'expression du gène. L'exon E2 du CD44 était retrouvé 2,5 fois plus abondant dans les cellules Tax WT que dans les cellules contrôles ( $p < 0,0001$ , Mann Whitney) alors que son expression restait inchangée après transfection des cellules avec le vecteur d'expression Tax M22 (**FIGURE 43C**). Afin de caractériser les exons variables inclus dans les transcrits CD44 des cellules exprimant Tax, nous avons amplifié cette région variable par Nested-RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de chaque exon variable. La **figure 43D** illustre le positionnement des oligonucléotides et présente un résultat typique des essais

réalisés en triplicate. Sous l'expression de Tax WT, l'expression du gène CD44 s'accompagnait d'une augmentation de l'inclusion des exons variables v3, v6, v7, v8, v9 et v10. Sur l'ensemble des répliques, l'expression du variant v10 était récurrente sous l'effet de Tax.



**Figure 43. Induction de l'expression et de l'inclusion des exons alternatifs de CD44 par Tax WT dans les cellules HEK293T.**

(A) Schéma de l'ARN pré-messager CD44 et position des oligonucléotides utilisés. (B) PCR avec les oligonucléotides situés sur les exons constants 5 et 8 (flèches rouges sur le schéma), dans les trois conditions : Ctrl, Tax WT et Tax M22. (C) RT-PCR quantitative sur l'exon constant 2 du CD44 dans les 3 conditions. (D) Nested-PCR avec des oligonucléotides spécifiques des exons variables et de l'exon constant 7 (flèches noires sur le schéma) dans les 3 conditions. RT-PCR représentative de plus de 3 essais. a.u. : arbitrary units.

Ayant identifié l'expression du transcrite CD44v10 dans les cellules exprimant Tax, nous avons recherché si l'apparition de ce transcrite coïncidait avec l'apparition du variant protéique CD44v10 à la membrane plasmique des cellules. Pour ce faire, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression du variant CD44v10 à la surface de la membrane plasmique des cellules HEK293T transitoirement transfectées par les plasmides d'expression de Tax et d'un plasmide d'expression du CD44v10, comparé aux cellules recevant le plasmide vide psg5. La **figure 44** confirme l'apparition significative d'une population exprimant le variant CD44v10 dans les conditions Tax et CD44v10.

Ces données nous ont amené à rechercher l'expression de l'isoforme d'épissage CD44v10 dans les cellules infectées *in vivo* et dans les lignées transformées par HTLV-1. Pour ce faire, nous avons tout d'abord recherché par RT-PCR quantitative en temps réel l'expression de ce variant dans les cellules de la lignées MT-2 impliquées ou non pour l'expression de Tax par interférence à ARN (siRNA). Comme le montre la **figure 45A**, les essais de quantification en temps réel par qRT-PCR permettait de confirmer une diminution de 60% des transcrits Tax dans la condition siRNATax, comparée à la condition contrôle siRNA-luc ( $p=0,0003$ , Mann Whitney). La réduction des transcrits Tax s'accompagnait d'une diminution de 25% ( $p=0,002$ , Mann Whitney) de l'expression globale de CD44 (exon E2) et d'une diminution de 45% ( $p=0,003$ , Mann Whitney) de l'expression du variant v10. Ces différences d'expression des exons E2 et V10 étaient significatives ( $0,028$ , Mann Whitney) soulignant l'importance de Tax dans l'inclusion de l'exon variable (**FIGURE 45A**). L'expression de l'ARN CD44v10 a également été recherché dans des clones T CD4+ obtenus par culture en dilution limite de cellules circulantes de patients infectés en absence de malignité. L'expression de CD44v10 a été quantifiée par qRT-PCR dans 7 clones infectés et 7 clones non infectés. Comme le montre la **figure 45B**, l'expression du variant v10 était significativement supérieure dans les clones infectés en comparaison aux clones non infectés ( $p=0,047$ ). Cette expression était positivement corrélée à l'expression de Tax mesurée par qRT-PCR ( $R=0,85$ ,  $p=0,0119$ , Pearson) (**FIGURE 45C**).

L'ensemble de ces données indique que Tax induit une surexpression ainsi qu'une inclusion d'exon alternatif de CD44 dépendante de l'activation de la voie NF-kB, en particulier l'inclusion de l'exon variable v10 de CD44. L'induction de l'exon v10 par Tax

aboutit à l'expression de l'isoforme protéique CD44v10. Cette régulation de l'expression de l'exon variable v10 de CD44 par Tax est retrouvée au niveau de la lignée lymphoïde HTLV-1 positive MT2. De plus, nous avons pu montrer une corrélation positive entre l'expression de Tax et de l'apparition de l'exon v10 de CD44 *in vivo* au niveau de lymphocytes T CD4+ provenant de patients naturellement infectés par le virus. Ces données suggèrent que les relations qui lient Tax à l'épissage alternatif du gène CD44 sont identiques entre notre modèle *in vitro* et les cellules T infectées *in vivo*.

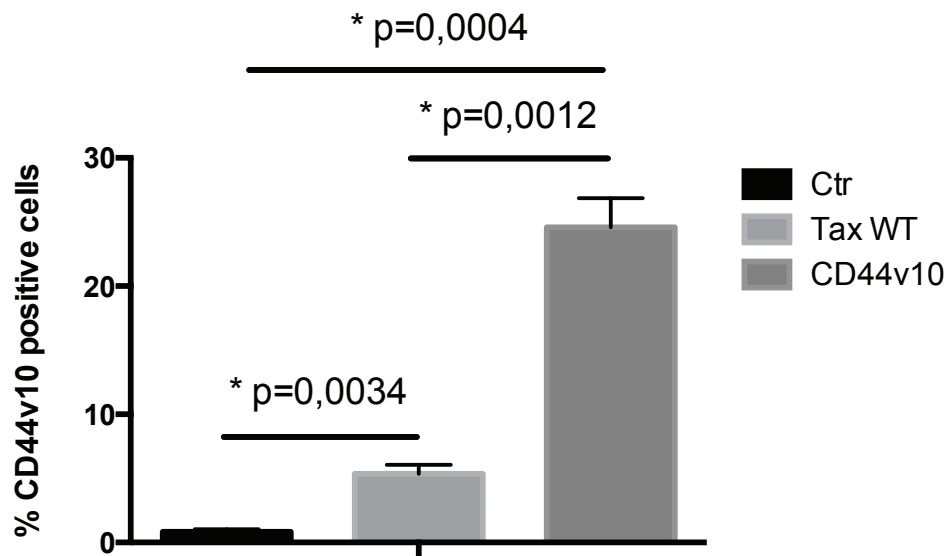
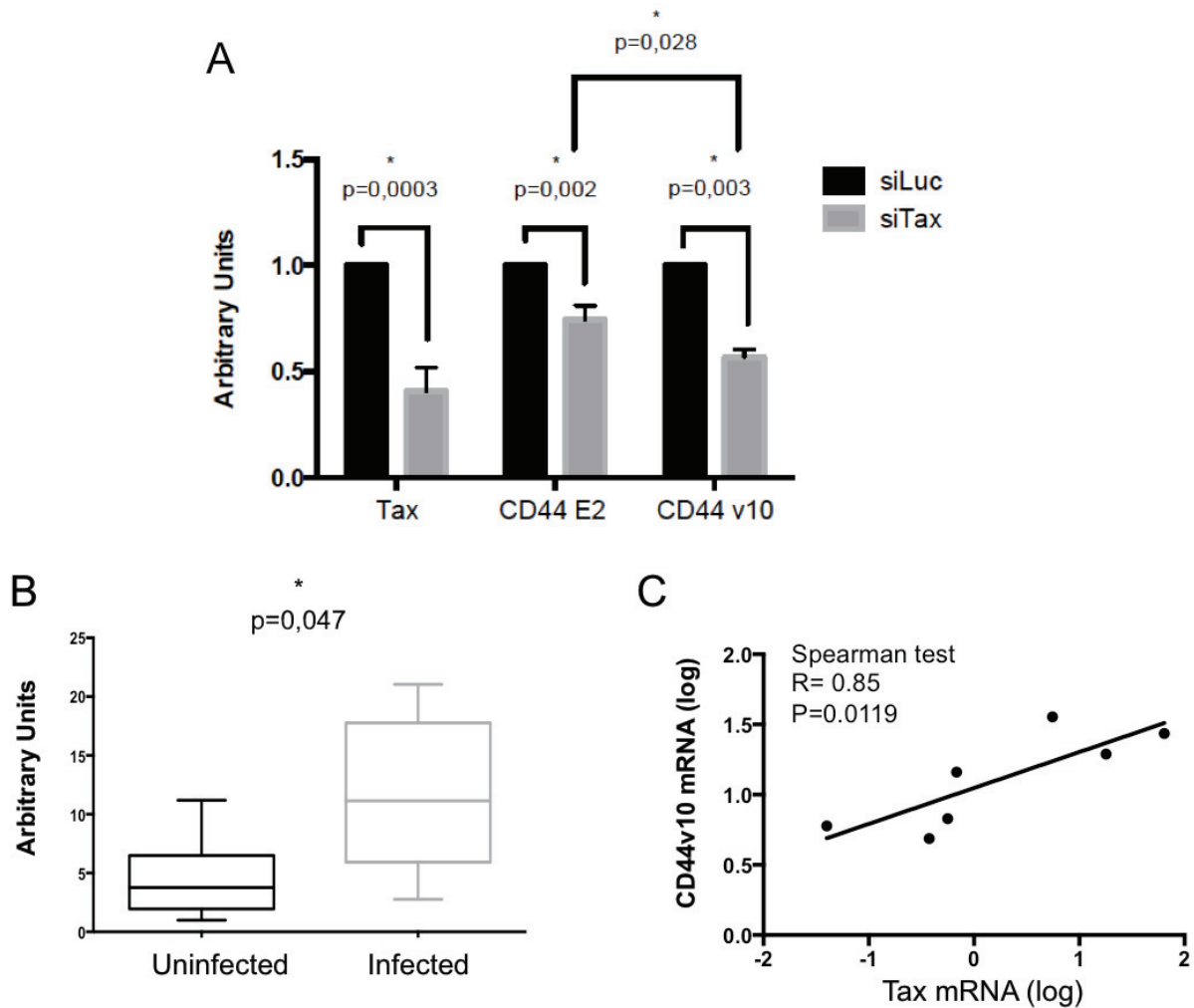


Figure 44. Etude de l'expression protéique de CD44 par FACS.

Les cellules HEK293T transfectées transitoirement avec un vecteur exprimant Tax WT ou CD44v10 ont été analysées en cytométrie en flux pour l'expression du variant CD44v10 à la surface des cellules à 48H post-transfection.





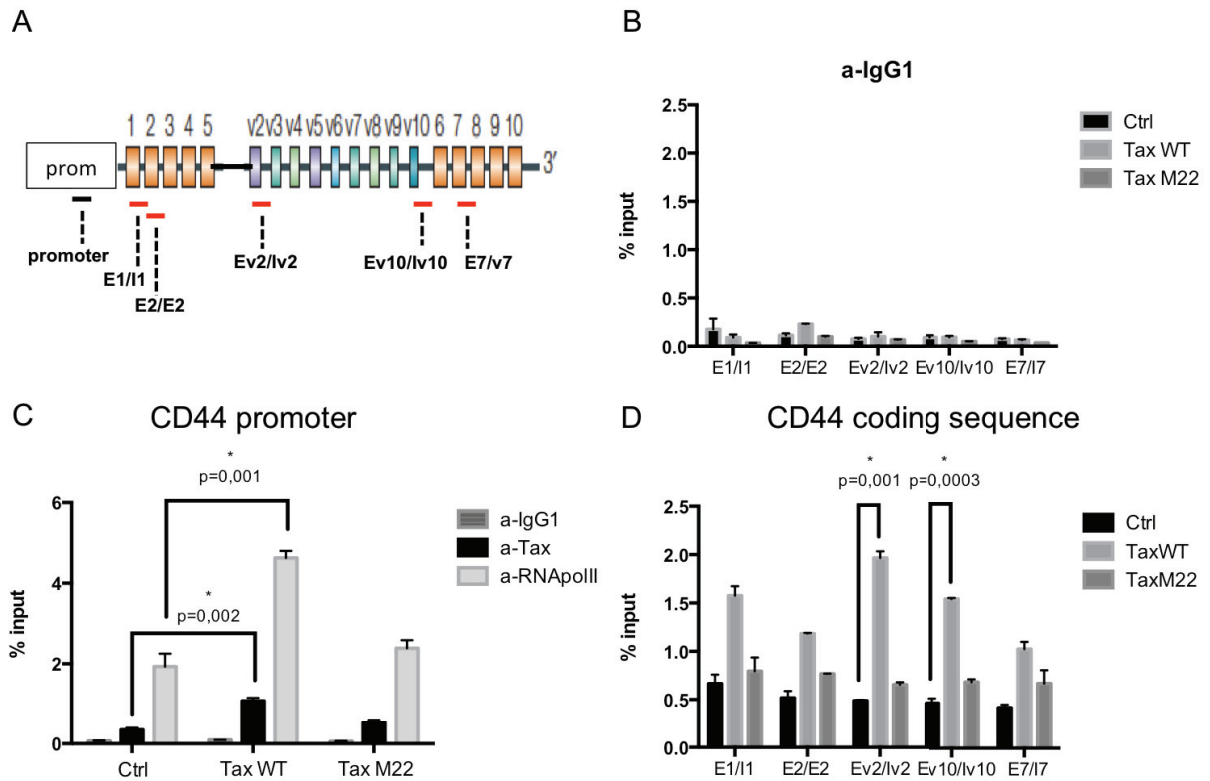
**Figure 45.** Corrélation entre l'expression de Tax et l'expression de CD44v10 dans la lignée MT2 ainsi que des clones T CD4+ infectés par le virus HTLV-1.

(A) RT-PCR quantitative de l'expression de CD44v10, CD44 E2 et Tax dans la lignée MT2 impliquée ou non pour l'expression de Tax par siRNA. (B) RT-PCR quantitative de l'expression de CD44v10 dans des clones T CD4+ infectés ou non par HTLV-1, issus d'un clonage en dilution limite de PBMC provenant de patients naturellement infectés par le virus. (C) Corrélation positive entre l'expression de Tax et l'expression de CD44v10 dans les clones T CD4+ infectés par HTLV-1.

### *B.3/ L'activation de la voie NF-kB par Tax induit le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau des exons variables de CD44*

Le gène CD44 a été largement étudié au niveau de la régulation de l'épissage de ces exons alternatifs. Ses mécanismes d'épissage sont étroitement couplés à la transcription et à la régulation de la chromatine, *via* notamment SWI/SNF, induisant les pauses de l'ARN polymérase II (forme phosphorylée en sérines 5 du CTD) au niveau des régions variables du gène, facilitant l'inclusion des exons variables en cours d'élongation de transcription (Batsche et al. 2006). L'effecteur p65/RelA de la voie NF-kB semble également jouer un rôle dans la phosphorylation de l'ARN polymérase II *via* le recrutement du facteur P-TEFb en interagissant avec la cycline T1 et BrD4 (Bromodomain-containing protein 4). En effet, il a été montré que l'acétylation de p65/RelA sur sa lysine 310 induit le recrutement de BRD4 qui a son tour recrute le facteur d'élongation P-TEFb (Huang et al. 2009; Brasier et al. 2011; Zou et al. 2013). Sachant que Tax intervient lui aussi également dans le complexe P-TEFb *via* la cycline T1 (Cho et al. 2010), ces données posent la question des mécanismes qui relient Tax, NF-kB et la régulation de l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II dans les processus d'épissage alternatif.

Pour adresser cette question, nous avons recherché si la distribution de l'ARN polymérase II (ARNpolIII) sur le promoteur et la région codante du CD44 pouvait être modifiée par l'expression des protéines Tax WT et Tax M22. La **Figure 46A** illustre les positions des amorces utilisées pour l'amplification des séquences de CD44 et montre que l'expression de Tax WT, et non celle de Tax M22, coïncidait avec une augmentation de l'occupation du promoteur CD44 par l'ARNpolIII de 2,4 fois ( $p=0,001$ ) par rapport au contrôle. De façon intéressante, dans ces cellules, l'amplification de la région promotrice CD44 immunoprecipitée par l'anticorps Tax était significativement plus importante que dans les cellules contrôles (facteur 3,1,  $p=0,002$ , Mann Whitney) indiquant que Tax était directement recrutée sur le promoteur du gène CD44. Ces effets n'étaient pas observés dans la condition Tax M22 suggérant que le recrutement de Tax sur le promoteur CD44 s'opérait *via* l'activation de la voie NF-kB.

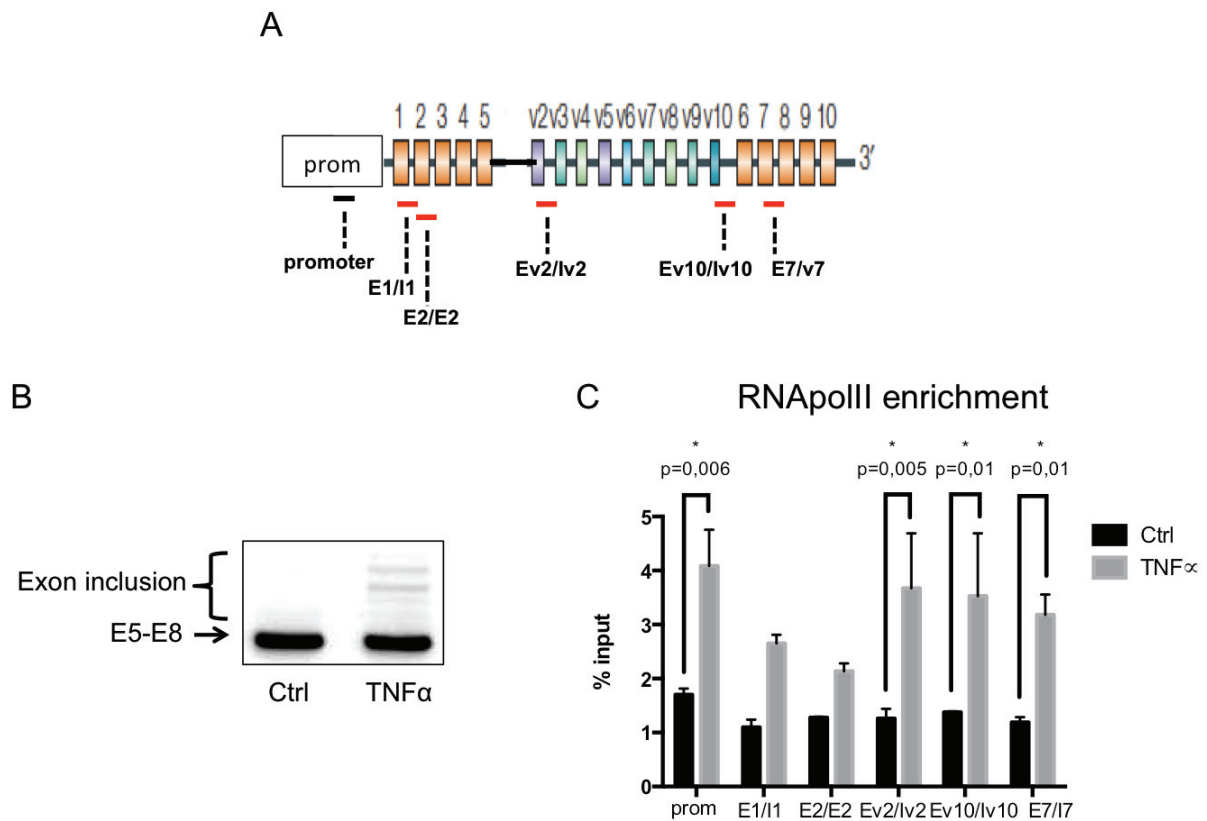


**Figure 46. Enrichissement de Tax et RNA polymérase II sur le promoteur et la région codante de CD44 dans les cellules HEK293T.**

(A) Schéma du gène CD44 et des régions amplifiées par PCR quantitatives. (B) Immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps non spécifique. (C) Immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps spécifique de l'ARNpolIII et de Tax sur le promoteur de CD44. (D) Immunoprécipitation de la chromatine de l'ARNpolIII sur la région codante de CD44.

Au niveau de la région codante de CD44, nous avons utilisé 2 couples d'amorces pour amplifier le début du gène (exon1/intron1 (E1/I1) et exon2/exon2 (E2/E2)). Deux autres couples ont permis l'amplification de la région comprenant les exons variables de CD44 : Ev2/Iv2 et Ev10/Iv10. Pour finir, la fin du gène a été amplifiée avec les amorces ciblant l'exon constant 7 (E7/I7) (**FIGURE 46A**). Par cette approche, nous avons observé dans les cellules contrôle une diminution progressive de la présence de l'ARNpolIII le long de la séquence codante (**FIGURE 46B**). Dans les cellules Tax WT, on observait un enrichissement globalement plus important de l'ARNpolIII le long du gène CD44 avec une distribution distincte de celle des cellules contrôles. En effet, dans ces cellules, la présence de l'ARNpolIII augmentait respectivement d'un facteur 4 ( $p=0,001$ ) et 3,3 ( $p=0,0003$ ) au niveau de l'exon v2 et v10 dans les cellules exprimant par rapport aux cellules contrôles. A l'inverse, le profil de distribution de l'ARNpolIII au niveau des cellules Tax M22 restait inchangé comparé aux contrôles (**FIGURE 46B**). Ces données indiquent que l'expression de Tax WT, et non Tax M22, induit un enrichissement des l'ARN polymérase II au niveau des exons variables de CD44. Cet effet de Tax sur l'ARNpolIII semble dépendant de l'activation de la voie NF-kB.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons recherché si l'activation de la voie NF-kB était capable d'induire les mêmes profils d'épissage alternatif et d'enrichissement de l'ARNpolIII sur le gène CD44 que ceux observés dans les cellules Tax. Pour ce faire, nous avons exposé les cellules pendant 2 heures à 25ng/ml de  $TNF\alpha$ , un activateur de la voie NF-kB. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine contre l'ARNpolIII montraient que ces cellules, comparées aux contrôles, présentaient un enrichissement de l'ARNpolIII au niveau des exons variables v2 et v10 de CD44 d'un facteur de 2,9 ( $p=0,005$ ) et 2,6 ( $p=0,01$ ) respectivement (**FIGURE 47B**). Comme démontré par Barshishat M & al., l'exposition des cellules HEK293T au  $TNF\alpha$  s'associe à une inclusion d'exons variables de CD44 dans l'ARN messager (**FIGURE 47A**) (Barshishat et al. 2002).



**Figure 47. Profil d'expression de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur et de la région codante de CD44 dans les cellules HEK293T.**

(A) Schéma du gène CD44 et des régions amplifiées par PCR quantitatives. (B) RT-PCR avec les oligonucléotides situés sur les exons constants 5 et 8 de CD44 en présence ou non de TNF $\alpha$  (25ng/ml). (C) Immunoprécipitation de la chromatine contre l'ARNpolIII pSer5 sur le promoteur et la région codante de CD44 en présence ou non de TNF $\alpha$  (25ng/ml) pendant 2h. RTPCR représentative de plus de 3 essais.

#### *B.4/ Tax, RelA et ARN polymérase II : des régulateurs de l'épissage alternatif de CD44*

Ayant mis en évidence une corrélation positive entre l'enrichissement de Tax et de l'ARNpolIII au niveau du promoteur de CD44, nous avons voulu regarder si Tax pouvait également être présente dans la séquence codante du gène CD44. Pour ce faire, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine contre Tax ont été réalisées dans les cellules contrôles, exprimant Tax WT ou Tax M22. De manière intéressante, Tax était retrouvée dans la séquence codante de CD44 avec une distribution hétérogène. Tax était notamment retrouvé plus abondamment dans les régions codant les exons variables que dans celles des exons constants (**FIGURE 48**). A l'inverse, le Tax M22 n'était pas retrouvé au niveau de la séquence codante de CD44.

Nous avons dans un premier temps émis l'hypothèse que ces différences entre Tax WT et Tax M22 dans leur distribution au gène CD44 pouvait dépendre de leur capacité à interagir avec l'ARNpolIII. Pour ce faire, des expériences de co-immunoprécipitation des protéines Tax et de l'ARNpolIII ont été réalisées. Comme on peut le voir sur la **figure 49**, en utilisant un anticorps spécifique de l'ARNpolIII, on observait que Tax WT et Tax M22 co-immunoprécipitaient avec l'ARNpolIII. Réciproquement, en utilisant l'anticorps spécifique de Tax, on observait que l'ARNpolIII co-immunoprécipitait avec Tax WT et Tax M22 (**FIGURE 49**). Les capacités de fixations à l'ARNpolIII des protéines Tax WT et M22 semblaient identiques, indiquant que les différents effets de Tax WT et TaxM22 sur la distribution de l'ARNpolIII au niveau du gène CD44 ne dépendait pas de leur affinité pour ce complexe.

L'inclusion des exons variables de CD44 dans les cellules Tax étant activées *via* la voie NF-kB, nous avons voulu savoir si l'effecteur de la voie RelA était capable d'expliquer la présence spécifique de Tax WT au niveau du gène CD44. En effet, une étude d'immunoprécipitation de la chromatine spécifique de RelA suivi d'un séquençage haut débit, a mis en évidence que RelA pouvait être retrouvé au niveau des séquences intragéniques dans les cellules HeLa (Xing et al. 2013).

### Tax enrichment

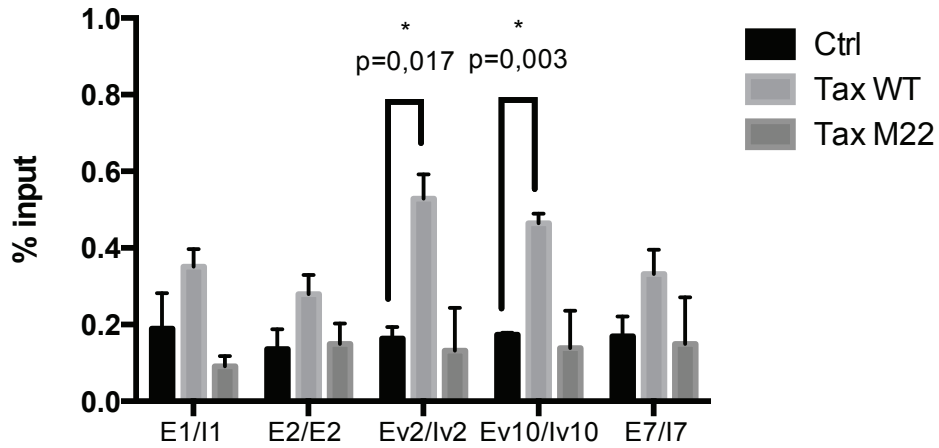


Figure 48. Distribution de Tax dans la séquence codante de CD44 dans les cellules HEK293T.

Immunoprécipitation de la chromatine contre Tax sur la région codante de CD44 dans les cellules contrôles et exprimant Tax WT ou Tax M22.

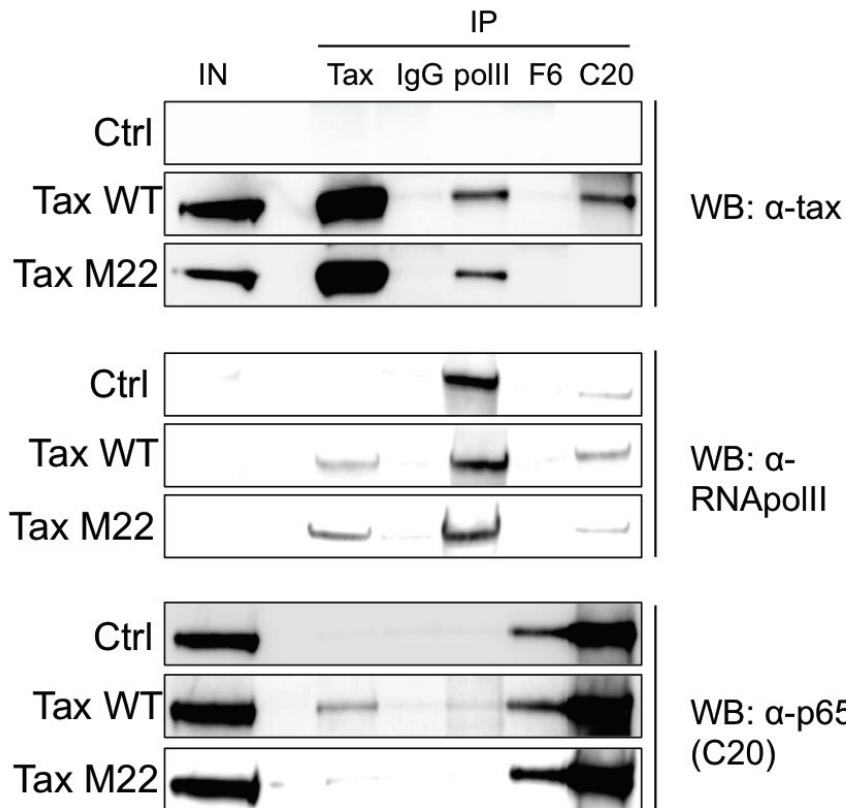


Figure 49. Co-immunoprécipitation de l'ARN polymérase II, Tax et RelA.

Expériences de co-immunoprécipitation ciblant Tax, l'ARNpolII et RelA dans les cellules transfectées par les vecteurs psg5-vide, psg5-Tax WT ou psg5-Tax M22. Co-immunoprécipitation représentatives de 3 essais indépendants. Tax : anticorps spécifique de Tax (1A3), polII : anticorps spécifique de l'ARNpolII (CTD4H8), F6 & C20 : 2 anticorps spécifiques de p65(RelA).



Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons analysé par des essais de co-immunoprécipitation la capacité d'interaction entre Tax WT/Tax M22 et RelA (**FIGURE 49**). En utilisant l'anticorps spécifique de Tax, on observait que RelA co-immunoprécipitait spécifiquement avec le Tax WT, alors qu'elle ne co-immunoprécipitait pas avec le Tax M22. De même, en utilisant 2 anticorps spécifiques de RelA (F6 et C20), on observait que Tax WT co-immunoprécipitait spécifiquement avec RelA par rapport au Tax M22 (**FIGURE 49**). Ces données indiquaient que Tax WT était retrouvé spécifiquement dans des complexes avec RelA par rapport au Tax M22.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la capacité d'interaction de RelA avec l'ARNpolIII dans les cellules contrôles, exprimant Tax WT ou Tax M22 (**FIGURE 49**). En utilisant l'anticorps spécifique de RelA (C20), on observait que l'ARNpolIII co-immunoprécipitait avec RelA dans les cellules contrôles, exprimant Tax WT ou Tax M22. Par contre, on observait que l'interaction de l'ARNpolIII avec RelA était plus importante dans les cellules exprimant le Tax WT (**FIGURE 49**). En effet, on pouvait observer sur le western blot spécifique de l'ARNpolIII, que le signal correspondant à l'immunoprécipitation de RelA avec l'anticorps C20 était plus intense dans les cellules Tax WT que les autres cellules. De plus, en utilisant l'anticorps spécifique de RelA F6, on pouvait observer que la co-immunoprécipitation de l'ARNpolIII avec RelA donnait un signal positif uniquement dans les cellules Tax WT (**FIGURE 49**). Pour finir, l'utilisation de l'anticorps spécifique de l'ARNpolIII, nous pouvons observer un signal positif de co-immunoprécipitation de RelA avec l'ARNpolIII uniquement au niveau des cellules Tax WT (**FIGURE 49**). Ces expériences de co-immunoprécipitation révélaient que Tax WT, et non Tax M22, interagissait avec RelA et l'ARNpolIII endogènes et augmentait les niveaux d'interaction de RelA avec l'ARNpolIII. Ces données suggéraient que Tax WT pourrait recruter RelA au niveau d'un complexe avec l'ARNpolIII.

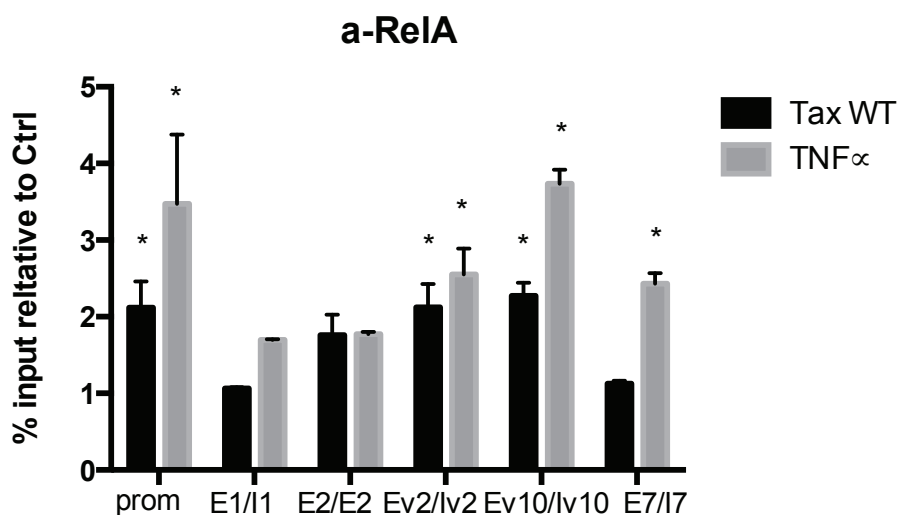
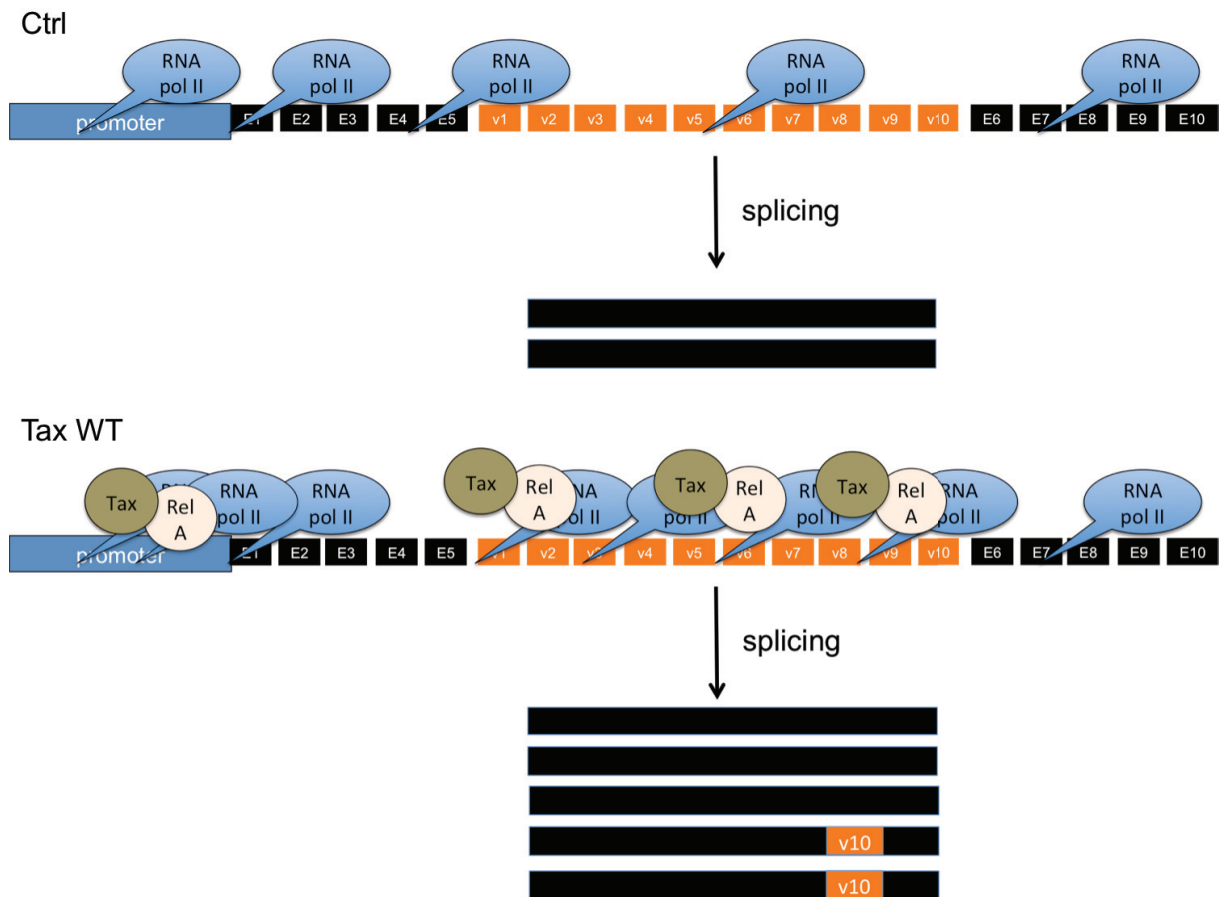


Figure 50. Distribution de p65 (RelA) au niveau du promoteur et de la région codante de CD44 dans les cellules HEK293T.

Immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps spécifique contre RelA (p65) sur la région codante de CD44 dans les cellules contrôles, exprimant Tax WT, ou exposées au TNF $\alpha$  (25ng/ml) pendant 2h. Les enrichissements significatifs par rapport au contrôle sont marqués par les \* ( $p < 0,05$ ).

Nous avons analysé la distribution de RelA sur le gène CD44 dans les cellules exprimant Tax WT ou traitées par le TNF $\alpha$ . Dans les conditions Tax WT et TNF $\alpha$ , on observe respectivement un enrichissement d'un facteur de 2,1 fois ( $p=0,004$ ) et 3,4 fois ( $p=0,0001$ ) de RelA sur le promoteur de CD44 en comparaison aux cellules contrôles (**FIGURE 50**). De plus, on observait un enrichissement générale de RelA au niveau de la région codante de CD44 par rapport aux cellules contrôles, avec notamment un enrichissement significatif au niveau des exons variables (**FIGURE 50**). Ces données indiquent que Tax, RelA et l'ARNpolIII forment des complexes particulièrement enrichis dans la séquence codante du gène CD44 au niveau régions des exons variables suggérant qu'ils puissent coopérer dans les mécanismes gouvernant l'inclusion de l'exon v10 dans les transcrits.

L'ensemble de ces données nous amène à proposer un modèle de régulation de l'épissage alternatif de CD44 par Tax (**FIGURE 51**). Dans les cellules contrôles, les sites d'épissage des exons alternatif de CD44 étant faibles, la cinétique d'élongation de l'ARN polymérase II ne permet pas l'inclusion des exons dans l'ARN messenger final. Dans les cellules exprimant Tax, l'activation de la voie NF-kB par Tax entraîne la translocation de RelA dans le noyau. Tax recrute RelA et l'ARN polymérase II au niveau du promoteur et la région variable de CD44. Tax et RelA pourraient être embarquées dans le complexe d'élongation. Par des mécanismes qu'il reste à démontrer, l'enrichissement de RelA au niveau du complexe d'élongation s'accompagne d'un ralentissement de la cinétique d'élongation de l'ARN polymérase II et conduit à l'inclusion des exons alternatifs dans l'ARN messenger final. Alternativement, Tax pourrait recruter RelA et l'ARN polymérase II au niveau de site cryptique NF-kB présents dans la région codante de CD44, ralentissant ainsi les ARNpolIII en transcription, induisant l'inclusion des exons alternatifs.



**Figure 51.** Modèle d'étude des effets de Tax et de NF-kB sur la régulation du couplage transcription/épissage de CD44 dans les cellules HEK293T.

Dans les cellules HEK293T contrôles, les exons variables de CD44 ne sont pas inclus dans l'ARN messager du à une vitesse d'élongation de l'ARNpolIII élevée. Lorsque Tax est exprimée, Tax recrute RelA et l'ARNpolIII au niveau du promoteur de CD44. On observe aussi un enrichissement de Tax, RelA et l'ARNpolIII au niveau de la région comprenant les exons variables de CD44. Cet enrichissement pourrait être la conséquence d'un ralentissement de la vitesse d'élongation de l'ARNpolIII à cause de la présence de Tax et RelA dans le complexe de transcription, ou bien par le recrutement de complexe RelA/RNAPolIII par Tax au niveau de la séquence codante de CD44, ralentissant ainsi la vitesse des ARN polymérase II en élongation. L'enrichissement de Tax, RelA et l'ARNpolIII au niveau des exons variables de CD44 est associé à l'inclusion de ces exons dans l'ARN messager final.

## C/ Conclusion

Ce travail démontre que outre ses effets sur les niveaux de transcription des gènes cellulaires, Tax influence également le transcriptome des cellules hôtes sur le plan qualitatif en intervenant dans la régulation de l'épissage alternatif. Dans les cellules exprimant Tax, 70% des gènes dérégulés qualitativement ne présentaient pas de variations significatives de leur niveau d'expression par rapport aux contrôles, indiquant que Tax est capable de moduler l'épissage alternatif indépendamment de ses effets sur la régulation quantitative des gènes. L'analyse ontologique indique que, sous l'effet de Tax, les modifications d'épissage alternatif concernaient majoritairement des gènes engagés dans les voies fonctionnelles contrôlant la prolifération et la transformation maligne telles que « Cancer » ou encore « MAP Kinase ». Un nombre important de ces modifications était dépendant des capacités de Tax à activer la voie de signalisation NF-kB. En particulier, nos résultats indiquent que Tax induit l'inclusion de l'exon variable v10 du gène CD44 dans les cellules infectées par HTLV-1 *in vivo*, les lignées transformées par HTLV-1 et dans les cellules HEK293T transfectées transitoirement. Au niveau moléculaire, les effets de Tax sur l'épissage alternatif de CD44 étaient dépendant de l'activation de la voie NF-kB et s'accompagnaient d'un enrichissement des protéines Tax et p65 (RelA) au niveau des exons variables de CD44, coïncidant avec une augmentation de l'ARN polymérase II dans cette région. Ces données définissent Tax comme un régulateur co-transcriptionnel de l'épissage *via* la modulation de l'enrichissement de l'ARN polymérase II.

Nos résultats révèlent que les effets de Tax sur l'expression des gènes cellulaires ne se limitent pas au recrutement de facteurs de transcription, de régulateurs de la chromatine, et/ou de la phosphorylation de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs cellulaires, mais dépendent également des actions de Tax sur la régulation du couplage transcription et épissage alternatif. Cette nouvelle fonction, n'étant pas restreinte aux effets quantitatifs de Tax sur l'expression des gènes, révèle tout un pan de dérégulations qualitatives mal connues jusqu'alors dans le cadre de l'infection. Une étude récente a démontré les actions de Tax dans l'inhibition du système NMD (Non-sens Mediated Decay), révélant *in vitro* des effets de Tax sur la demi-vie des ARN cellulaires et viraux (Mocquet et al. 2012). Par ses actions combinées sur les processus

d'épissage et NMD, Tax apparaît comme un acteur majeur de la reprogrammation qualitative des ARN cellulaires.

Les effets de l'activation de la voie NF-κB sur la transcription des gènes contrôlant la prolifération cellulaire et la réponse inflammatoire ont été largement décrits. Dans le cadre de l'infection, de nombreux travaux définissent Tax comme un outil important de dissection des mécanismes qui relient la voie NF-κB et l'expression des gènes. Nos données montrent que le nombre de gène quantitativement dérégulés est réduit d'environ 5 fois lorsque Tax est rendu défectif dans l'activation de la voie NF-κB. Ces données sont en accord avec les travaux précédents (Portis et al. 2001). Ces gènes transcriptionnellement modifiés par NF-κB sont aussi caractérisés comme des acteurs majeurs du développement tumoral associé à HTLV-1. En effet, chez l'animal l'infection expérimentale avec des provirus codant un Tax défectif pour la voie NF-κB ne permettent pas la transformation maligne des cellules infectées (Yamaoka et al. 1996). De même l'inhibition de la voie NF-κB dans les cellules ATLL permet d'induire leur mort par apoptose (Mori et al. 1999; Mori et al. 2002). Nos résultats indiquent qu'en plus des défauts quantitatifs, le mutant Tax M22 présente une réduction importante de ses capacités à moduler qualitativement l'expression des gènes cellulaires, en modifiant 3 fois moins de gènes en épissage alternatif que sa contrepartie sauvage. Ces données revisitent les effets de l'activation de NF-κB dans les cellules exprimant Tax et posent la question du rôle des événements d'épissage qui en résultent dans la persistance de l'infection et le développement des pathologies associées à HTLV-1.

Au plan moléculaire, nos résultats révèlent que l'expression de Tax induit une augmentation de RelA fixée au gène CD44 et plus particulièrement dans les régions codant les exons variables. L'exposition des cellules au TNFα permettait de reproduire cette distribution qui était corrélée à l'inclusion de l'exon CD44v10. Ces données sont en accord avec les effets du TNFα sur l'épissage du CD44 démontrés dans les cellules du cancer du colon (Barshishat et al. 2002) et avec la distribution de RelA dans les régions intragéniques et introniques identifiés dans les cellules HeLa (Xing et al. 2013). Les données de Chip-seq anti-RelA disponibles sur la base de données UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) indiquent également un enrichissement de RelA dans la séquence codante de CD44 de lignées B infectées par EBV et exposées au TNFα. Nous

montrons aussi que l'enrichissement de RelA par Tax et par TNF $\alpha$  coïncident avec une augmentation du nombre de RNA polymérase II dans les régions d'exons variables du gène CD44, suggérant que RelA pourrait influencer la cinétique de l'élongation transcriptionnelle et son couplage avec l'épissage. Ces données rappellent les fonctions de régulation co-transcriptionnelles de l'épissage révélées pour d'autres facteurs de transcription tels que WT1 ou PSF (Davies et al. 1998; Kameoka et al. 2004; Morrison et al. 2008).

Il est aujourd'hui bien établi qu'une grande majorité des processus d'épissage alternatif est couplée à la cinétique d'élongation de l'ARN polymérase II par différents paramètres incluant le recrutement différentiel de facteur de transcription au niveau du promoteur, les modifications post-traductionnelles du CTD de l'ARN polymérase II, ou encore l'état de compaction de la chromatine et les niveaux de méthylation de l'ADN (Montes et al. 2012a; Dujardin et al. 2013). Sachant que, outre l'activation des voies NF-kB, les effets de Tax sur l'expression des gènes cellulaires reposent également sur de nombreuses autres facteurs tels que CREB/ATF et SRF, les facteurs de remodelage de la chromatine CBP/p300, HDAC et SWI/SNF, et les régulateurs de méthylation des histones et de l'ADN, ces données font proposer que Tax puisse altérer l'épissage alternatif par des voies multiples, autres que NF-kB (Curren et al. 2012). Cette hypothèse expliquerait en partie les effets du mutant Tax M22 sur la dérégulation d'épissage alternatif de plus de 350 gènes et ouvre d'autres voies d'investigations des mécanismes reliant Tax et l'épissage.

L'ARN du CD44v10 a pu être retrouvé dans les cellules infectées par HTLV-1 issues d'un clonage en dilution limite des PBMC d'individus infectés. Un travail précédant avait pu rapporter que les variants CD44v6 et CD44v10 étaient retrouvés à la surface des cellules circulantes de patients atteints de TSP/HAM, sans toutefois relier cette expression directement aux cellules infectées. Bien que le faible nombre de cellules ne nous permettait pas d'analyser au niveau protéique l'expression de ce variant dans les clones issus de patient, nos données *in vitro* indiquent que l'expression du transcrits CD44v10 associée à Tax aboutissait à l'exposition à la surface des cellules des variants v10 de la glycoprotéine d'enveloppe. Les variants CD44 ayant été décrits dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires, il serait intéressant d'évaluer le rôle du variant v10

dans les capacités des cellules T infectées à traverser la barrière hémato-encéphalique et atteindre le liquide céphalo-rachidien et le système nerveux central. Les variants de d'épissage de CD44 ont été par ailleurs caractérisés pour leur capacités pro-invasives au niveau de différents types de cellules cancéreuses (Williams et al. 2013). Leurs expressions sont corrélées au stade avancé de certains cancers tels que les HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) (Wang and Bourguignon 2011). L'activité de NF- $\kappa$ B étant constitutive dans les cellules d'ATLL, il serait aussi intéressant d'évaluer l'expression des variants d'épissage de CD44 dans les formes indolentes, chroniques, lymphomateuses et aiguës des ATLL.

En conclusion, ces résultats mettent à jour de nouvelles propriétés de Tax et de NF- $\kappa$ B dans la régulation de l'épissage alternatif. Ces données pourraient expliquer le nombre important de dérégulations d'épissage dans les cellules infectées issues de patient et tout particulièrement dans les ATLL où l'activation de NF- $\kappa$ B est constitutive. Notre compréhension des stratégies mises en place par HTLV-1 pour détourner la machinerie d'expression des gènes des cellules hôtes doit donc être revisitée afin d'intégrer que certains transcrits, pouvant être non modifiés dans leur abondance, peuvent subir des remaniements d'épissage associés à Tax et produire des protéines de structures et de fonctions différentes. Les travaux futurs devront s'intéresser à préciser les mécanismes et les effets fonctionnels de ces modifications d'épissage pour en préciser les rôles dans l'infection chronique et la pathogenèse liées à HTLV-1.



## **MATERIELS ET METHODES**

## 1/ Culture Cellulaire

### A/ Echantillons de patients

Les cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC) ont été obtenues à partir de patients infectés par HTLV-1 et diagnostiqués TSP/HAM (n=3) ou ATLL (charge provirale >95%) (n=9). La durée de maladie des patients TSP/HAM était respectivement de 6, 11 et >26 ans. Les cellules T CD4+ proviennent de donneurs HTLV-1 négatifs.

### B/ Clonage en dilution limite des cellules T

Après soustraction des cellules adhérentes, les PBMC ont été clonées en dilution limite dans des plaques Terasaki à la concentration de 0,1 cellules par puits. Les lymphocytes T ont été cultivés dans du milieu RPMI 1640 contenant de la pénicilline et de la streptomycine, du pyruvate sodium, une solution d'acides aminés non essentiels, du 2-mercaptoéthanol, 10% de sérum humain AB, 100 U/ml d'IL2 recombinant (Chiron corporation) et 75  $\mu$ M d'inhibiteur d'intégrase d'HTLV-1 L-731,988 (Rabaaoui et al. 2008). Les plaques Terasaki ont été incubées à 37°C pendant 14 jours. Les cultures positives ont été transférées dans des plaques 96 puits à fond en U dans le même milieu, et ont été restimulées tous les 14 jours avec de la PHA (1  $\mu$ g/ml). Une couche de cellules irradiées servant de tapis nutritif ( $0,5 \times 10^6$ /ml).

### C/ Cytométrie en Flux

Pour le phénotypage des clones, les anticorps reconnaissant les marqueurs CD4 et CD8 ont été achetés chez *DakoCytomation*. Pour l'analyse de CD44v10 dans les HEK293T,  $5 \cdot 10^5$  cellules par essai ont été reprises dans 500  $\mu$ L de PBS 0,1% BSA et incubées sur la nuit avec ou sans l'anticorps primaire anti-CD44v10 (AB2082). Après deux rinçages au PBS, les cellules ont été incubées pendant une heure avec un anticorps secondaires couplé au fluorochrome Alexa Fluor 555 (fluorescence rouge). Après trois rinçages au PBS, les mesures ont été effectuées dans un volume total de 1 mL de PBS. Les données ont été acquises avec FACScan et analysées avec CellQuest (Becton Dickinson).

#### D/ Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires MOLT4 (cellules périphériques du sang d'un individu avec une leucémie lymphoblastique aigüe), MT2 (cellules de sang de cordon infectées par HTLV-1 lors d'une co-culture et des cellules infectées par le virus HTLV-1), HuT-102 (cellules périphériques du sang de patient infectés par HTLV-1) ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, de la L-glutamine, de la pénicilline (5 µg/ml) et de la streptomycine (5 µg/ml). Les cellules HEK293T LTR-HTLV-1-GFP (lignée 293T ayant intégré de façon stable un gène GFP sous contrôle du LTR de HTLV-1) et HEK293T (cellules de rein embryonnaire humain) ont été cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 µg/mL de pénicilline et streptomycine.

#### E/ Transfections

Les cellules ont été transfectées avec le kit JetPRIME (Polyplus Transfection). 3.10<sup>6</sup> cellules HEK293T ont étéensemencées par boîte de culture de 10 cm de diamètre. Le lendemain, 500 µL de JetPRIME<sup>TM</sup> buffer ont été mélangés à 24 µL de JetPRIME et à 2 µg du plasmide d'intérêt (psg5-vide, psg5-Tax WT, psg5-Tax M22). Après une attente de dix minutes, 500 µL de la solution de transfection ont été ajoutés dans chaque boîte, puis les cellules ont été placées dans l'incubateur à 37°C. Le lendemain, le milieu de culture a été changé. Les cellules ont été récupérées 24h plus tard pour les expériences.

#### F/ Test de prolifération MTT

100 µl de milieu contenant 5 X 10<sup>4</sup> cellules ont été distribués dans des plaques 96 puits en présence de concentrations variables de Sudemycine E (Fan et al. 2011) ou du DMSO. Le jour du test, les cellules ont été incubées pendant 1h avec 15 µl de solution de marquage MTT. Le surnageant a été enlevé et les cellules ont été ensuite incubées pendant 1h à température ambiante avec 100 µl de solution de solubilisation. La densité optique a été mesurée par un lecteur ELISA à 570 nm, en utilisant 650 nm comme

référence. Le taux de prolifération cellulaire a été réalisé par le test MTT (Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega).

## **2/ Biologie moléculaire**

### **A/ Extraction d'ARN et transcription inverse**

L'ARN a été isolé par le TRIzol (Invitrogen), suivant les instructions du fabricant. La concentration des ARN ainsi que leur pureté ont été déterminées par spectrophotométrie ultraviolette (Nanodrop). Avant la transcription inverse, l'ARN a été traité avec la DNase (DNase-free™, Invitrogen) suivant les instructions du fabricant, pour prévenir toute contamination d'ADN. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN en utilisant des amorces aléatoires, suivant les instructions du fabricant (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Invitrogen).

### **B/ Hybridation et analyse statistique des données de puces exon Affymetrix**

5 µg d'ADNc ont été préparés et hybridés sur puces exon spécifiques (Affymetrix-GeneChip Human Exon 1.0 ST arrays ou Exon-Junction arrays (Affymetrix)). Les données des puces exons ont été annotées *via* FasterDB (<http://fasterdb.lyon.unicancer.fr/>) Les données Affymetrix ont été normalisées par quantiles. La correction du bruit de fond ainsi que la sélection des sondes ont été réalisées comme décrit précédemment (Clark et al. 2007). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test t de Student sur les valeurs de l'indice d'épissage (splicing index (SI)), qui correspond au rapport entre 2 conditions expérimentales, de l'intensité de l'expression de exon normalisé par l'expression du gène (Clark et al. 2007).

### **C/ Réaction de polymérisation en chaine (PCR)**

Les réactions de polymérisation en chaine ont été réalisées entre 30-35 cycles de polymérisation, en utilisant la Hercule II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) suivant les instructions du fabricant. Les produits de PCR ont été migrés par

électrophorèse en gel d'agarose avec du bromure d'éthidium, et révélés sous lampe Ultraviolette.

#### **D/ Réaction quantitative de polymérisation en chaine (qPCR)**

Les ADNc (ADN pour les ChIP) ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaine dans un volume de 20  $\mu$ l, en utilisant le QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen). Les réactions ont été réalisées sur le Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Science). Le gène HPRT1 a été utilisé comme contrôle interne. Une courbe de dissociation (57-95°C) a été réalisée pour chaque couple d'amorces, afin de vérifier leur spécificité. La méthode Pfaffl a été utilisée pour les quantifications.

#### **E/ Immunoprécipitation de la chromatine**

Les cellules HEK293T transfectées par les différents plasmides sont crosslinkées par ajout de formaldéhyde (1% final) pendant 10 minutes à température ambiante sous légère agitation. La réaction est stoppée par ajout de glycine (0,25M final, pH=7,5) pendant 5 minutes. Les cellules sont rincées au PBS froid (1X) et récupérées par grattage de la boîte. Après centrifugation pendant 5 minutes à 5000 rpm, les cellules sont à nouveau rincées et centrifugées.

Dans la glace, les cellules sont suspendus et incubées dans 300 $\mu$ l de Tampon de Lyse pendant 10 minutes (50mM Tris-HCl pH=7,5, 150mM KCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% Sodium Deoxycholate, 1X inhibiteur de protéas (Roche), 1X cocktail 1 & 2 d'inhibition de phosphatase (Roche)). Les cellules sont ensuite soniquées pendant 15 minutes (30 secondes on, 30 secondes of) pour avoir des fragments entre 200 et 800 bp. 200 $\mu$ l de tampon sont ajoutés. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 13000 rpm.

Avant l'immunoprécipitation, 50 $\mu$ l de billes magnétiques protéine G (Dynal, Invitrogene) sont incubés avec les extrait pendant 2 heures à 4°C pour fixer toute ce qui est aspécifique. Les extraits prélevés sont ensuite incubés avec 2 $\mu$ g des différents anticorps (RelA :clone C20, Tax : clone 1A3, RNAPolIII : clones CTD4H8) sur la nuit à 4°C. 10% de

l'extrait est gardés pour servir de contrôle d'input. Le lendemain, les extraits avec les anticorps sont incubés pendant 2 heures à 4°C avec 50µl de billes magnétiques préalablement bloquées avec de la BSA sur la nuit à 4°C.

Les billes magnétiques sont ensuite lavées 5 fois avec 800µl de Tampon de lavage (50mM Tris-HCL pH=7,5, 150mM KCl, 1% NP40, 0,25% Sodium deoxycholate), puis 2 fois avec du tampon TE (10mM Tris-HCl pH=7,5, 1mM EDTA). Les billes sont reprises dans 100µl de tampon de resuspension (50mM Tris-HCl pH=7,5, 5mM EDTA, 10mM DTT, 1% SDS) et le crosslink est reversé par chauffage à 65°C pendant 5 heures (ainsi que l'input).

Les extraits sont traités ensuite à la RNase A pendant 15 minutes à 37°C puis à la protéinase K pendant 1 heure à 45°C en agitant de temps en temps les billes. L'ADN est extrait par le phénol/chloroforme, précipité à l'éthanol 100% et quantifié par PCR quantitative.

#### **F/ Co-immunoprécipitation**

Les cellules sont lysées avec du tampon de lyse (20mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 2mM EDTA, anti-protéase (roche), anti-phosphatase cocktail 2 & 3 (roche)) et mis en agitation pendant 30 minutes à 4°C. Avant l'immunoprécipitation, 50µl de billes magnétiques protéine G (Dynal, Invitrogene) sont incubés avec les extrait pendant 2 heures à 4°C pour fixer toute ce qui est aspécifique. Les extraits prélevés sont ensuite incubés avec 2µg des différents anticorps (RelA : clone C20 ou F6, Tax : clone 1A3, RNAPolIII : clones CTD4H8) sur la nuit à 4°C. 10% de l'extrait est gardés pour servir de contrôle d'input. Le lendemain, les extraits avec les anticorps sont incubés pendant 2 heures à 4°C avec 50µl de billes magnétiques préalablement bloquées avec de la BSA sur la nuit à 4°C. Les billes magnétiques sont ensuite lavées 5 fois avec le tampon de lyse, resuspendu dans du tampon lameli 1X, chauffées à 95°C pendant 10 minutes et analysés par western blot.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Les dérégulations de l'expression des gènes cellulaires sont des signatures de l'infection par HTLV-1. Cependant leur étude n'a été réalisée jusqu'à ce jour qu'à l'échelle transcriptionnelle sans tenir compte des réarrangements structuraux des transcrits dont on sait aujourd'hui étroitement couplés à la transcription. Nos travaux mettent à jour un nombre important de modifications qualitatives des transcrits cellulaires dans les cellules T CD4+ infectées qui culminent au stade tumoral de l'infection. Ces réarrangements incluent des épissages alternatifs mettant en jeu des cassettes exons, des rétentions d'intron, des choix alternatifs de sites accepteurs ou donneurs d'épissage, mais également des sélections alternatives de promoteurs et/ou de sites de polyadénylations. Nos approches moléculaires ont permis d'identifier l'oncoprotéine virale Tax comme un des acteurs de ces dérégulations. Tax favorise l'inclusion d'exons variables du gène CD44 *via* l'activation de la voie NF-kB et l'enrichissement de l'ARN polymérase II au sein des régions codant ces exons. L'analyse des profils d'exons des cellules exprimant de façon ectopique Tax révélait également une grande variété de type d'évènements, dépendant ou non de la voie NF-kB, indiquant que les effets qualitatifs de Tax se composent d'un large spectre de modifications, et très certainement de mécanismes, autres que la seule régulation de l'inclusion d'exons cassettes. Ces données ouvrent un large champ d'investigation dans lequel il semble important de relier dorénavant les mécanismes qui lient les fonctions transcriptionnelles de Tax, largement décrites aujourd'hui, et ses effets sur l'épissage alternatif, le choix de promoteurs et/ou de sites de polyadénylation. Ces nouvelles propriétés reliées à Tax et à l'infection devront par la suite être évaluées sur le plan fonctionnel à l'échelle de la cellule mais également *in vivo* afin de définir leurs rôles dans la physiopathologie de l'infection. Dans cette perspective, différentes études pourraient être dans la continuité de ce travail :

Dans un objectif de valorisation clinique des signatures d'expression d'exon des ATLL, il semble important d'analyser un plus grand nombre d'échantillons tumoraux en discriminant les différents types d'ATLL: indolentes, chroniques, aiguës et lymphomateuses. Par cette approche, il serait possible de rechercher si les événements d'épissage alternatif peuvent constituer des marqueurs d'intérêt diagnostique, pronostique, et ou de suivi de la réponse au traitement.



A la phase chronique de l'infection, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sont les réservoirs majeurs du HTLV-1. Des études réalisées au laboratoire ont montré que l'expansion clonale des cellules T infectées reposent sur 2 mécanismes distincts dépendant de leur phénotype. Les cellules T CD4 infectées apparaissent propulsées dans le cycle cellulaire dans un contexte d'instabilité génomique alors que les cellules T CD8<sup>+</sup> infectées s'accumulent par une résistance accrue aux phénomènes apoptotiques (Sibon et al. 2006) s'expliquant par des dérégulation d'expression de gènes régulant l'apoptose et le système télomère/téломérase (Zane et al. 2012). Ces données permettent d'expliquer en partie pourquoi seules les cellules T CD4<sup>+</sup> aboutissent à la transformation maligne. Dans ce contexte, il serait intéressant de comparer les profils d'expression d'exons des cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> infectées. Mes travaux se sont intéressés aux cellules infectées *in vivo*, reflétant les effets sur l'épissage alternatif du HTLV-1 mais aussi de la sélection clonale des cellules infectées *in vivo*. Il serait donc intéressant de comparer ces données à des infections *de novo* réalisées *in vitro* afin d'identifier les évènements d'épissage sélectionnés pour la persistance du virus *in vivo* et l'oncogénèse.

Nos essais d'exposition des cellules infectées à la Sudemycin E indiquent que les lignées MT-2 et HUT102 infectées par HTLV-1 sont extrêmement sensibles à la drogue de l'épissage. Ces drogues montrent *in vitro* des bonnes efficacités anti-tumorales sur de nombreux tissus, mais les résultats chez les patients semblent moins encourageants (Eskens et al. 2013; Hong et al. 2013). Ces études rapportent néanmoins que, malgré une faible incidence sur la masse des tumeurs solides traitées, les drogues d'épissages impactaient significativement les cellules circulantes des patients. Ces données laissent entrevoir la possibilité d'une meilleure réponse aux traitements anti-épissage dans les situations de pathologies hématologiques. Dans ce contexte, notre équipe, en collaboration avec les groupes de Madeleine Duc Dodon (ENS Lyon) et de Thomas Webb (SRI International, CA, USA), envisage de tester ces drogues dans le modèle d'infection expérimental de la souris humanisée dans lequel HTLV-1 permet d'induire un développement tumoral similaire en de nombreux points à l'ATLL (Villaudy et al. 2011). Les effets des drogues seront étudiés lors de la phase chronique de l'infection et de la phase tumorale en analysant la clonalité des cellules infectées, les charges provirales et l'impact sur les populations cellulaires non-infectées.

Au plan moléculaire, notre deuxième axe de travail a permis de relier Tax et l'activation de la voie NF-kB à l'enrichissement de l'ARN polymérase II au niveau des régions codant les exons inclus dans les transcrits CD44. Afin d'étudier si les autres évènements exon-cassettes, retrouvés modifiés sous l'activation de la voie NF-kB par Tax, subissent les mêmes mécanismes, nous avons abordés des essais de Chip-Seq de l'ARNpolIII dans les cellules exprimant ou non Tax WT ou Tax M22. La comparaison des données d'enrichissement de la RNAPolIII à l'échelle du génome nous permettra d'analyser finement si l'expression de Tax (et/ou NF-kB) se traduit par une redistribution caractéristique au pourtour des exons alternatifs dérégulés. Comme contrôles nous utiliserons des exons alternatifs insensibles aux effets de l'oncoprotéine virale. J'espère pouvoir présenter une partie des résultats de cette étude à la soutenance de thèse.

Les activités de Tax sont finement régulées par des modifications post-traductionnelles incluant l'ubiquitinylation, la SUMOylation et l'acétylation. En particulier, l'ubiquitinylation et la SUMOylation ont été montrées comme des régulateurs critique de la localisation de Tax et l'activation de la voie NF-kB. Il serait intéressant d'évaluer si les effets de Tax sur l'épissage alternatif peuvent être modulés par ces modifications post-traductionnelles.

L'étude des conséquences fonctionnelles des modulations d'épissage alternatif peut être facilitée lorsque les modifications d'épissage concernent des domaines protéiques bien caractérisés. Sur ce plan, CD44 fait partie des gènes les plus étudiés dans le domaine de l'épissage et de nombreux outils moléculaires sont aujourd'hui disponibles. Plusieurs études ont montré que l'épissage alternatif de CD44 était altéré dans certains cancers, et que certaines isoformes, en particulier le variant v10, ont été associées à une augmentation de la migration cellulaire, à l'invasion, et au caractère métastatique des tumeurs (Wallach-Dayana et al. 2001; Weimann et al. 2003; Wang et al. 2009). Nous analysons actuellement les propriétés de migration et d'invasion des cellules exprimant Tax dans des essais *in vitro*. Nous avons déjà validé que l'expression ectopique du variant CD44v10 permettait une augmentation de la migration des cellules HEK293T dans des puits transwell. Nous rechercherons aussi si l'involition par siRNA spécifique des transcrits comportant l'exon v10 influence significativement le comportement migratoire des cellules Tax positives.

Enfin, il semble également important d'analyser les effets d'autres facteurs viraux sur l'épissage des transcrits des cellules infectées. En particulier, le facteur Rex possède un domaine de liaison à l'ARN et est impliqué dans l'inhibition de l'épissage et l'export des ARNm viraux. Rex a été identifié comme un compétiteur de hnRNPA1 pour la liaison avec les ARN viraux (Dodon et al. 2002). Par cette voie, Rex pourrait donc potentiellement interférer avec la régulation de l'épissage alternatif des transcrits cellulaires. Nous sommes actuellement en train d'analyser les effets de Rex sur l'épissage alternatif en utilisant la même approche que celle réalisée pour étudier les effets de Tax sur l'épissage.

## REFERENCES

- Alefantis T, Flaig KE, Wigdahl B, Jain P. 2007. Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **61**: 194-200.
- Alefantis T, Mostoller K, Jain P, Harhaj E, Grant C, Wigdahl B. 2005. Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *The Journal of biological chemistry* **280**: 17353-17362.
- Alexandre C, Verrier B. 1991. Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* **6**: 543-551.
- Allemand E, Batsche E, Muchardt C. 2008. Splicing, transcription, and chromatin: a menage a trois. *Current opinion in genetics & development* **18**: 145-151.
- Andresen V, Pise-Masison CA, Sinha-Datta U, Bellon M, Valeri V, Washington Parks R, Cecchinato V, Fukumoto R, Nicot C, Franchini G. 2011. Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* **118**: 1549-1559.
- Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. 2007. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* **81**: 13922-13926.
- Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A et al. 2013. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer science* **104**: 1097-1106.
- Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S et al. 2009. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* **114**: 3208-3215.
- Baek D, Green P. 2005. Sequence conservation, relative isoform frequencies, and nonsense-mediated decay in evolutionarily conserved alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12813-12818.
- Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowers Y, Lider O, Schwartz B. 2002. TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis* **19**: 327-337.
- Batsche E, Yaniv M, Muchardt C. 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* **13**: 22-29.
- Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, Tortevoeye P, Otroock Z, Taylor G, Gessain A, Harrington W, Panelatti G, Hermine O. 2010. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 4177-4183.

- Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C. 2010. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* **115**: 2441-2448.
- Berg MG, Singh LN, Younis I, Liu Q, Pinto AM, Kaida D, Zhang Z, Cho S, Sherrill-Mix S, Wan L et al. 2012. U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell* **150**: 53-64.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 3171-3175.
- Bex F, Murphy K, Wattiez R, Burny A, Gaynor RB. 1999. Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation. *Journal of virology* **73**: 738-745.
- Beyer AL, Osheim YN. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes & development* **2**: 754-765.
- Bird G, Zorio DA, Bentley DL. 2004. RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation. *Molecular and cellular biology* **24**: 8963-8969.
- Bodaghi S, Jia R, Zheng ZM. 2009. Human papillomavirus type 16 E2 and E6 are RNA-binding proteins and inhibit in vitro splicing of pre-mRNAs with suboptimal splice sites. *Virology* **386**: 32-43.
- Bonnal S, Vigevani L, Valcarcel J. 2012. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nature reviews Drug discovery* **11**: 847-859.
- Bonnet A, Randrianarison-Huetz V, Nzounza P, Nedelec M, Chazal M, Waast L, Pene S, Bazarbachi A, Mahieux R, Benit L et al. 2012. Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* **9**: 77.
- Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. 2008. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* **5**: 76.
- Brasier AR, Tian B, Jamaluddin M, Kalita MK, Garofalo RP, Lu M. 2011. RelA Ser276 phosphorylation-coupled Lys310 acetylation controls transcriptional elongation of inflammatory cytokines in respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology* **85**: 11752-11769.
- Breathnach R, Benoist C, O'Hare K, Gannon F, Chambon P. 1978. Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4853-4857.
- Breathnach R, Mandel JL, Chambon P. 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* **270**: 314-319.

- Brody Y, Neufeld N, Bieberstein N, Causse SZ, Bohnlein EM, Neugebauer KM, Darzacq X, Shav-Tal Y. 2011. The in vivo kinetics of RNA polymerase II elongation during co-transcriptional splicing. *PLoS biology* **9**: e1000573.
- Burton M, Upadhyaya CD, Maier B, Hope TJ, Semmes OJ. 2000. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *Journal of virology* **74**: 2351-2364.
- Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, Chase MR, Vazquez A, Holthaus AM, Ewence AE, Li N, Hirozane-Kishikawa T, Hill DE et al. 2007. Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 7606-7611.
- Caron C, Mengus G, Dubrowskaya V, Roisin A, Davidson I, Jalinot P. 1997. Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3662-3667.
- Caron C, Rousset R, Beraud C, Moncollin V, Egly JM, Jalinot P. 1993. Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *The EMBO journal* **12**: 4269-4278.
- Carrillo Oesterreich F, Preibisch S, Neugebauer KM. 2010. Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Molecular cell* **40**: 571-581.
- Cavrois M, Gessain A, Gout O, Wain-Hobson S, Wattel E. 2000. Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *The Journal of infectious diseases* **182**: 1044-1050.
- Cavrois M, Leclercq I, Gout O, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. 1998. Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. *Oncogene* **17**: 77-82.
- Celotto AM, Graveley BR. 2001. Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. *Genetics* **159**: 599-608.
- Charames GS, Cheng H, Gilpin CA, Hunter AG, Berk T, Bapat B. 2002. A novel aberrant splice site mutation in the APC gene. *Journal of medical genetics* **39**: 754-757.
- Chen HC, Cheng SC. 2012. Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience reports* **32**: 345-359.
- Chen X, Zachar V, Zdravkovic M, Guo M, Ebbesen P, Liu X. 1997. Role of the Fas/Fas ligand pathway in apoptotic cell death induced by the human T cell lymphotropic virus type I Tax transactivator. *The Journal of general virology* **78 ( Pt 12)**: 3277-3285.

- Chen ZJ. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature cell biology* **7**: 758-765.
- Cheng C, Sharp PA. 2006. Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Molecular and cellular biology* **26**: 362-370.
- Cheng J, Kydd AR, Nakase K, Noonan KM, Murakami A, Tao H, Dwyer M, Xu C, Zhu Q, Marasco WA. 2007. Negative regulation of the SH2-homology containing protein-tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) P2 promoter by the HTLV-1 Tax oncoprotein. *Blood* **110**: 2110-2120.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**: 1759-1762.
- Chevalier SA, Durand S, Dasgupta A, Radonovich M, Cimarelli A, Brady JN, Mahieux R, Pise-Masison CA. 2012. The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PloS one* **7**: e41003.
- Ching YP, Chan SF, Jeang KT, Jin DY. 2006. The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nature cell biology* **8**: 717-724.
- Chlichlia K, Khazaie K. 2010. HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chemico-biological interactions* **188**: 359-365.
- Cho WK, Jang MK, Huang K, Pise-Masison CA, Brady JN. 2010. Human T-lymphotropic virus type 1 Tax protein complexes with P-TEFb and competes for Brd4 and 7SK snRNP/HEXIM1 binding. *Journal of virology* **84**: 12801-12809.
- Cho WK, Zhou M, Jang MK, Huang K, Jeong SJ, Ozato K, Brady JN. 2007. Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *Journal of virology* **81**: 11179-11186.
- Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1-8.
- Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, Abbs S, Garralda ME, Bourke J, Wells DJ et al. 2011. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* **378**: 595-605.
- Clark TA, Schweitzer AC, Chen TX, Staples MK, Lu G, Wang H, Williams A, Blume JE. 2007. Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome biology* **8**: R64.
- Clemens KE, Piras G, Radonovich MF, Choi KS, Duvall JF, DeJong J, Roeder R, Brady JN. 1996. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Molecular and cellular biology* **16**: 4656-4664.



- Clerc I, Polakowski N, Andre-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard JM, Lemasson I. 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. *The Journal of biological chemistry* **283**: 23903-23913.
- Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, Hermine O, Lepelletier Y, Herbeuval JP. 2010. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **115**: 2177-2185.
- Cook LB, Rowan AG, Melamed A, Taylor GP, Bangham CR. 2012. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* **120**: 3488-3490.
- Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. 2009. RNA and disease. *Cell* **136**: 777-793.
- Corrionero A, Minana B, Valcarcel J. 2011. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes & development* **25**: 445-459.
- Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, Kornblihtt AR. 1999. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular cell* **4**: 251-258.
- Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR. 1997. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11456-11460.
- Currer R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, Narayanan A, Kashanchi F. 2012. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Frontiers in microbiology* **3**: 406.
- Dall P, Hekele A, Ikenberg H, Goppinger A, Bauknecht T, Pfeleiderer A, Moll J, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P. 1996. Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinogenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer* **69**: 79-85.
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. 2002. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *Journal of virology* **76**: 8124-8137.
- Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND. 1998. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes & development* **12**: 3217-3225.
- De Conti L, Baralle M, Buratti E. 2013. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **4**: 49-60.

- de La Fuente C, Deng L, Santiago F, Arce L, Wang L, Kashanchi F. 2000. Gene expression array of HTLV type 1-infected T cells: Up-regulation of transcription factors and cell cycle genes. *AIDS research and human retroviruses* **16**: 1695-1700.
- de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular cell* **12**: 525-532.
- de la Mata M, Kornblihtt AR. 2006. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature structural & molecular biology* **13**: 973-980.
- de la Mata M, Lafaille C, Kornblihtt AR. 2010. First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. *RNA* **16**: 904-912.
- De Sandre-Giovannoli A, Levy N. 2006. Altered splicing in prelamin A-associated premature aging phenotypes. *Progress in molecular and subcellular biology* **44**: 199-232.
- de The G, Bomford R. 1993. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS research and human retroviruses* **9**: 381-386.
- Deckert J, Hartmuth K, Boehringer D, Behzadnia N, Will CL, Kastner B, Stark H, Urlaub H, Luhrmann R. 2006. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Molecular and cellular biology* **26**: 5528-5543.
- Deng N, Sanchez CG, Lasky JA, Zhu D. 2013. Detecting splicing variants in idiopathic pulmonary fibrosis from non-differentially expressed genes. *PloS one* **8**: e68352.
- Dodon MD, Hamaia S, Martin J, Gazzolo L. 2002. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 interferes with the binding of the human T cell leukemia virus type 1 rex regulatory protein to its response element. *The Journal of biological chemistry* **277**: 18744-18752.
- Dodon MD, Li Z, Hamaia S, Gazzolo L. 2004. Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *The Journal of general virology* **85**: 1921-1932.
- Douglas KB, Windels DC, Zhao J, Gadeliya AV, Wu H, Kaufman KM, Harley JB, Merrill J, Kimberly RP, Alarcon GS et al. 2009. Complement receptor 2 polymorphisms associated with systemic lupus erythematosus modulate alternative splicing. *Genes and immunity* **10**: 457-469.
- Du L, Kayali R, Bertoni C, Fike F, Hu H, Iversen PL, Gatti RA. 2011. Arginine-rich cell-penetrating peptide dramatically enhances AMO-mediated ATM aberrant splicing correction and enables delivery to brain and cerebellum. *Human molecular genetics* **20**: 3151-3160.

- Ducu RI, Dayaram T, Marriott SJ. 2011. The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* **416**: 1-8.
- Dujardin G, Lafaille C, Petrillo E, Buggiano V, Gomez Acuna LI, Fiszbein A, Godoy Herz MA, Nieto Moreno N, Munoz MJ, Allo M et al. 2013. Transcriptional elongation and alternative splicing. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 134-140.
- Durkin SS, Guo X, Fryrear KA, Mihaylova VT, Gupta SK, Belgnaoui SM, Haoudi A, Kupfer GM, Semmes OJ. 2008. HTLV-1 Tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **283**: 36311-36320.
- Dutertre M, Sanchez G, De Cian MC, Barbier J, Dardenne E, Gratadou L, Dujardin G, Le Jossic-Corcus C, Corcos L, Auboeuf D. 2010. Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nature structural & molecular biology* **17**: 1358-1366.
- Easley R, Carpio L, Guendel I, Klase Z, Choi S, Kehn-Hall K, Brady JN, Kashanchi F. 2010. Human T-lymphotropic virus type 1 transcription and chromatin-remodeling complexes. *Journal of virology* **84**: 4755-4768.
- Enose-Akahata Y, Abrams A, Massoud R, Bialuk I, Johnson KR, Green PL, Maloney EM, Jacobson S. 2013. Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. *Retrovirology* **10**: 19.
- Eskens FA, Ramos FJ, Burger H, O'Brien JP, Piera A, de Jonge MJ, Mizui Y, Wiemer EA, Carreras MJ, Baselga J et al. 2013. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the first-in-class spliceosome inhibitor E7107 in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 6296-6304.
- Fan L, Lagisetti C, Edwards CC, Webb TR, Potter PM. 2011. Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. *ACS chemical biology* **6**: 582-589.
- Fan X, Tang L. 2013. Aberrant and alternative splicing in skeletal system disease. *Gene*.
- Feigal E, Murphy E, Vranizan K, Bacchetti P, Chaisson R, Drummond JE, Blattner W, McGrath M, Greenspan J, Moss A. 1991. Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *The Journal of infectious diseases* **164**: 36-42.
- Forsman A, Ruetschi U, Ekholm J, Rymo L. 2008. Identification of intracellular proteins associated with the EBV-encoded nuclear antigen 5 using an efficient TAP procedure and FT-ICR mass spectrometry. *Journal of proteome research* **7**: 2309-2319.
- Fraedrich K, Muller B, Grassmann R. 2005. The HTLV-1 Tax protein binding domain of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) includes the regulatory PSTAIRE helix. *Retrovirology* **2**: 54.

- Fujii M, Niki T, Mori T, Matsuda T, Matsui M, Nomura N, Seiki M. 1991. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene* **6**: 1023-1029.
- Fukumoto R, Andresen V, Bialuk I, Cecchinato V, Walser JC, Valeri VW, Nauroth JM, Gessain A, Nicot C, Franchini G. 2009. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. *Blood* **113**: 3726-3734.
- Fung MM, Chu YL, Fink JL, Wallace A, McGuire KL. 2005. IL-2- and STAT5-regulated cytokine gene expression in cells expressing the Tax protein of HTLV-1. *Oncogene* **24**: 4624-4633.
- Furukawa Y, Osame M, Kubota R, Tara M, Yoshida M. 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.
- Gabet AS, Mortreux F, Charneau P, Riou P, Duc-Dodon M, Wu Y, Jeang KT, Wattel E. 2003. Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* **22**: 3734-3741.
- Gabet AS, Mortreux F, Talarmin A, Plumelle Y, Leclercq I, Leroy A, Gessain A, Clity E, Joubert M, Wattel E. 2000. High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene* **19**: 4954-4960.
- Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. 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. *Journal of virology* **76**: 12813-12822.
- Geiger TR, Sharma N, Kim YM, Nyborg JK. 2008. The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Molecular and cellular biology* **28**: 1383-1392.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **2**: 407-410.
- Gessain A, Cassar O. 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology* **3**: 388.
- Gessain A, Mahieux R. 2012. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Revue neurologique* **168**: 257-269.
- Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C et al. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of virology* **80**: 6844-6854.

- Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, Comoglio PM, Green MR, Riva S, Biamonti G. 2005. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular cell* **20**: 881-890.
- Ghosh S, Garcia-Blanco MA. 2000. Coupled in vitro synthesis and splicing of RNA polymerase II transcripts. *RNA* **6**: 1325-1334.
- Gilden RV, Long CW, Hanson M, Toni R, Charman HP, Oroszlan S, Miller JM, Van der Maaten MJ. 1975. Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukaemia virus. *The Journal of general virology* **29**: 305-314.
- Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. 2011. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* **117**: 3113-3122.
- Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhart PF, Heuvelmans N, Holling T, Janson AA, Platenburg GJ, Sipkens JA et al. 2011. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *The New England journal of medicine* **364**: 1513-1522.
- Goldstrohm AC, Albrecht TR, Sune C, Bedford MT, Garcia-Blanco MA. 2001. The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1. *Molecular and cellular biology* **21**: 7617-7628.
- Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**: 5976-5985.
- Grassmann R, Berchtold S, Radant I, Alt M, Fleckenstein B, Sodroski JG, Haseltine WA, Ramstedt U. 1992. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *Journal of virology* **66**: 4570-4575.
- Gray SG, Iglesias AH, Lizcano F, Villanueva R, Camelo S, Jingu H, Teh BT, Koibuchi N, Chin WW, Kokkotou E et al. 2005. Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **280**: 28507-28518.
- Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, Rio DC, Brenner SE. 2003. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* **19 Suppl 1**: i118-121.
- Grigsby IF, Zhang W, Johnson JL, Fogarty KH, Chen Y, Rawson JM, Crosby AJ, Mueller JD, Mansky LM. 2010. Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology* **7**: 75.
- Grossman WJ, Kimata JT, Wong FH, Zutter M, Ley TJ, Ratner L. 1995. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1057-1061.

- Gu B, Eick D, Bensaude O. 2013. CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. *Nucleic acids research* **41**: 1591-1603.
- Haller K, Wu Y, Derow E, Schmitt I, Jeang KT, Grassmann R. 2002. Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Molecular and cellular biology* **22**: 3327-3338.
- Hamasaki S, Nakamura T, Furuya T, Kawakami A, Ichinose K, Nakashima T, Nishiura Y, Shirabe S, Eguchi K. 2001. Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology* **117**: 143-148.
- Haoudi A, Semmes OJ. 2003. The HTLV-1 tax oncoprotein attenuates DNA damage induced G1 arrest and enhances apoptosis in p53 null cells. *Virology* **305**: 229-239.
- Hara T, Matsumura-Arioka Y, Ohtani K, Nakamura M. 2008. Role of human T-cell leukemia virus type I Tax in expression of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human T-cells. *Cancer science* **99**: 1155-1163.
- Harhaj EW, Good L, Xiao G, Sun SC. 1999. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* **18**: 1341-1349.
- Harhaj EW, Sun SC. 1999. IKKgamma serves as a docking subunit of the Ikbpp kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *The Journal of biological chemistry* **274**: 22911-22914.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H et al. 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nature medicine* **12**: 466-472.
- He C, Zhou F, Zuo Z, Cheng H, Zhou R. 2009. A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. *PloS one* **4**: e4732.
- Herold N, Will CL, Wolf E, Kastner B, Urlaub H, Luhrmann R. 2009. Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of Drosophila melanogaster and human spliceosomal complexes. *Molecular and cellular biology* **29**: 281-301.
- Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. 2011. CD44 in hematological neoplasias. *Annals of hematology* **90**: 493-508.
- Hidaka M, Inoue J, Yoshida M, Seiki M. 1988. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *The EMBO journal* **7**: 519-523.



- Ho YK, Zhi H, DeBiaso D, Philip S, Shih HM, Giam CZ. 2012. HTLV-1 tax-induced rapid senescence is driven by the transcriptional activity of NF-kappaB and depends on chronically activated IKKalpha and p65/RelA. *Journal of virology* **86**: 9474-9483.
- Hong DS, Kurzrock R, Naing A, Wheler JJ, Falchook GS, Schiffman JS, Faulkner N, Pilat MJ, O'Brien J, Lorusso P. 2013. A phase I, open-label, single-arm, dose-escalation study of E7107, a precursor messenger ribonucleic acid (pre-mRNA) spliceosome inhibitor administered intravenously on days 1 and 8 every 21 days to patients with solid tumors. *Investigational new drugs*.
- Horiuchi S, Ampofo W, Koyanagi Y, Yamashita A, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N. 1998. High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia/HTLV-I-associated myelopathy. *Immunology* **95**: 360-369.
- Horiuchi S, Koyanagi Y, Tanaka Y, Waki M, Matsumoto A, Zhou YW, Yamamoto M, Yamamoto N. 1997. Altered interleukin-2 receptor alpha-chain is expressed in human T-cell leukaemia virus type-I-infected T-cell lines and human peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukaemia patients through an alternative splicing mechanism. *Immunology* **91**: 28-34.
- Horiuchi S, Yamamoto N, Dewan MZ, Takahashi Y, Yamashita A, Yoshida T, Nowell MA, Richards PJ, Jones SA, Yamamoto N. 2006. Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling. *International journal of cancer Journal international du cancer* **119**: 823-830.
- Hoskins AA, Moore MJ. 2012. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in biochemical sciences* **37**: 179-188.
- Hsin JP, Manley JL. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & development* **26**: 2119-2137.
- Huang B, Yang XD, Zhou MM, Ozato K, Chen LF. 2009. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Molecular and cellular biology* **29**: 1375-1387.
- Huang L, Wilkinson MF. 2012. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **3**: 807-828.
- Hull J, Campino S, Rowlands K, Chan MS, Copley RR, Taylor MS, Rockett K, Elvidge G, Keating B, Knight J et al. 2007. Identification of common genetic variation that modulates alternative splicing. *PLoS genetics* **3**: e99.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**: 1713-1716.

- Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. 2013. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus genes* **46**: 39-46.
- Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Yoshida T, Osawa Y, Okazaki K. 2013. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Veterinary microbiology* **167**: 364-371.
- Ip JY, Schmidt D, Pan Q, Ramani AK, Fraser AG, Odom DT, Blencowe BJ. 2011. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome research* **21**: 390-401.
- Ip JY, Tong A, Pan Q, Topp JD, Blencowe BJ, Lynch KW. 2007. Global analysis of alternative splicing during T-cell activation. *RNA* **13**: 563-572.
- Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, Geng H, Deffenbacher K, Smith L, Dybkaer K et al. 2010. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* **115**: 1026-1036.
- Irimia M, Blencowe BJ. 2012. Alternative splicing: decoding an expansive regulatory layer. *Current opinion in cell biology* **24**: 323-332.
- Ito T, Watanabe H, Yamamichi N, Kondo S, Tando T, Haraguchi T, Mizutani T, Sakurai K, Fujita S, Izumi T et al. 2008. Brm transactivates the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene and modulates the splicing patterns of its transcripts in concert with p54(nrb). *The Biochemical journal* **411**: 201-209.
- Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. 2009. Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **7**: 1084-1091.
- Izquierdo JM. 2010. Cell-specific regulation of Fas exon 6 splicing mediated by Hu antigen R. *Biochemical and biophysical research communications* **402**: 324-328.
- Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. 1990. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* **348**: 245-248.
- Jeang KT, Widen SG, Semmes OJt, Wilson SH. 1990. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* **247**: 1082-1084.
- Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN et al. 1999. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 3848-3853.



- Jeffreys AJ, Flavell RA. 1977. The rabbit beta-globin gene contains a large large insert in the coding sequence. *Cell* **12**: 1097-1108.
- Jeyaraj S, O'Brien DM, Chandler DS. 2009. MDM2 and MDM4 splicing: an integral part of the cancer spliceome. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 2647-2656.
- Jiang H, Lu H, Schiltz RL, Pise-Masison CA, Ogryzko VV, Nakatani Y, Brady JN. 1999. PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Molecular and cellular biology* **19**: 8136-8145.
- Jin DY, Spencer F, Jeang KT. 1998. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* **93**: 81-91.
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. 2003. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**: 2141-2144.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of virology* **79**: 12692-12702.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. 2008. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature medicine* **14**: 429-436.
- Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, Dreyfuss G. 2010. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* **468**: 664-668.
- Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, Watanabe H, Kitahara T, Yoshida T, Nakajima H et al. 2007. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nature chemical biology* **3**: 576-583.
- Kaida D, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. 2012. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer science* **103**: 1611-1616.
- Kalsotra A, Cooper TA. 2011. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nature reviews Genetics* **12**: 715-729.
- Kameoka S, Duque P, Konarska MM. 2004. p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *The EMBO journal* **23**: 1782-1791.
- Kamihira S, Atogami S, Sohda H, Momita S, Toryia K, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M. 1994. DNA aneuploidy of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia research* **18**: 79-84.
- Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T. 2006. SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology* **3**: 5.

- Kanamori H, Suzuki N, Siomi H, Nosaka T, Sato A, Sabe H, Hatanaka M, Honjo T. 1990. HTLV-1 p27<sup>rex</sup> stabilizes human interleukin-2 receptor alpha chain mRNA. *The EMBO journal* **9**: 4161-4166.
- Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M et al. 2012. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* **119**: 2141-2148.
- Kannian P, Green PL. 2010. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* **2**: 2037-2077.
- Karam M, Thenoz M, Capraro V, Robin JP, Pinatel C, Lancon A, Galia P, Sibon D, Thomas X, Ducastelle-Lepretre S et al. 2014. Chromatin Redistribution of the DEK Oncoprotein Represses hTERT Transcription in Leukemias. *Neoplasia* **16**: 21-30.
- Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. 2007. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology* **14**: 185-193.
- Kawai H, Saito M, Takagi M, Tsuchihashi T, Arai Y, Kondo A, Iwasa M, Hirose T, Hizawa K, Saito S. 1992. Hashimoto's thyroiditis in HTLV-I carriers. *Intern Med* **31**: 1213-1216.
- Kawakami A, Nakashima T, Sakai H, Urayama S, Yamasaki S, Hida A, Tsuboi M, Nakamura H, Ida H, Migita K et al. 1999. Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* **94**: 3847-3854.
- Kawakami H, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Tanaka Y, Fujii M, Hatano M, Tokuhisa T, Mori N. 2005. Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *International journal of cancer Journal international du cancer* **115**: 967-974.
- Kchour G, Rezaee R, Farid R, Ghantous A, Rafatpanah H, Tarhini M, Kooshyar MM, El Hajj H, Berry F, Mortada M et al. 2013. The combination of arsenic, interferon-alpha, and zidovudine restores an "immunocompetent-like" cytokine expression profile in patients with adult T-cell leukemia lymphoma. *Retrovirology* **10**: 91.
- Kehn K, Fuente Cde L, Strouss K, Berro R, Jiang H, Brady J, Mahieux R, Pumfery A, Bottazzi ME, Kashanchi F. 2005. The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* **24**: 525-540.
- Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, Falaleeva M, Stamm S. 2013. Function of alternative splicing. *Gene* **514**: 1-30.
- Kendall EA, Gonzalez E, Espinoza I, Tipismana M, Verdonck K, Clark D, Vermund SH, Gotuzzo E. 2009. Early neurologic abnormalities associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in a cohort of Peruvian children. *The Journal of pediatrics* **155**: 700-706.

- Khodor YL, Menet JS, Tolan M, Rosbash M. 2012. Cotranscriptional splicing efficiency differs dramatically between *Drosophila* and mouse. *RNA* **18**: 2174-2186.
- Khodor YL, Rodriguez J, Abruzzi KC, Tang CH, Marr MT, 2nd, Rosbash M. 2011. Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*. *Genes & development* **25**: 2502-2512.
- Kibler KV, Jeang KT. 2001. CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Journal of virology* **75**: 2161-2173.
- Kimura I. 1992. [HABA (HTLV-I associated bronchiolo-alveolar disorder)]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai zasshi* **30**: 787-795.
- Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, Guglieri M, Ashton E, Abbs S, Nihoyannopoulos P et al. 2009. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet neurology* **8**: 918-928.
- Kirschbaum-Slager N, Lopes GM, Galante PA, Riggins GJ, de Souza SJ. 2004. Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genetics and molecular research : GMR* **3**: 512-520.
- Koga H, Imada K, Ueda M, Hishizawa M, Uchiyama T. 2004. Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer science* **95**: 411-417.
- Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS, Ahringer J. 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics* **41**: 376-381.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Dujardin G, Petrillo E, Munoz MJ. 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 153-165.
- Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi M, Ishihama Y, Iwata M, Mizui Y. 2007. Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nature chemical biology* **3**: 570-575.
- Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. 1993. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* **196**: 25-33.
- Kozar K, Sicinski P. 2005. Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell cycle* **4**: 388-391.
- Kress AK, Kalmer M, Rowan AG, Grassmann R, Fleckenstein B. 2011. The tumor marker Fascin is strongly induced by the Tax oncoprotein of HTLV-1 through NF-kappaB signals. *Blood* **117**: 3609-3612.

- Krueger A, Fas SC, Giaisi M, Bleumink M, Merling A, Stumpf C, Baumann S, Holtkotte D, Bosch V, Krammer PH et al. 2006. HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* **107**: 3933-3939.
- Kryworuckho M, Diaz-Mitoma F, Kumar A. 1995. CD44 isoforms containing exons V6 and V7 are differentially expressed on mitogenically stimulated normal and Epstein-Barr virus-transformed human B cells. *Immunology* **86**: 41-48.
- Kwok RP, Lurance ME, Lundblad JR, Goldman PS, Shih H, Connor LM, Marriott SJ, Goodman RH. 1996. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature* **380**: 642-646.
- Lacoste J, Petropoulos L, Pepin N, Hiscott J. 1995. Constitutive phosphorylation and turnover of I kappa B alpha in human T-cell leukemia virus type I-infected and Tax-expressing T cells. *Journal of virology* **69**: 564-569.
- Lagiseti C, Palacios G, Goronga T, Freeman B, Caufield W, Webb TR. 2013. Optimization of Antitumor Modulators of Pre-mRNA Splicing. *Journal of medicinal chemistry* **56**: 10033-10044.
- LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* **336**: 1345-1347.
- Lai MC, Teh BH, Tarn WY. 1999. A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *The Journal of biological chemistry* **274**: 11832-11841.
- Lairmore MD, Haines R, Anupam R. 2012. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current opinion in virology* **2**: 474-481.
- Lamolle G, Marin M, Alvarez-Valin F. 2006. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutation research* **600**: 102-112.
- Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Molecular and cellular biology* **25**: 10391-10406.
- Lara-Pezzi E, Gomez-Salinerio J, Gatto A, Garcia-Pavia P. 2013. The Alternative Heart: Impact of Alternative Splicing in Heart Disease. *Journal of cardiovascular translational research*.
- Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK. 1989. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochemical and biophysical research communications* **163**: 1006-1013.

- Lee N, Pimienta G, Steitz JA. 2012. AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *RNA* **18**: 2073-2082.
- Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, Hivin P, Cavanagh MH, Thebault S, Barbeau B, Nyborg JK, Mesnard JM. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *Journal of virology* **81**: 1543-1553.
- Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. 2006. Tax-dependent displacement of nucleosomes during transcriptional activation of human T-cell leukemia virus type 1. *The Journal of biological chemistry* **281**: 13075-13082.
- Lemoine FJ, Kao SY, Marriott SJ. 2000. Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS research and human retroviruses* **16**: 1623-1627.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 189-192.
- Li X, Manley JL. 2005. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* **122**: 365-378.
- Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR. 2001. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nature genetics* **27**: 55-58.
- Lodewick J, Lamsoul I, Bex F. 2011. Move or die: the fate of the Tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* **3**: 829-857.
- Lodewick J, Lamsoul I, Polania A, Lebrun S, Burny A, Ratner L, Bex F. 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.
- Lu H, Pise-Masison CA, Fletcher TM, Schiltz RL, Nagaich AK, Radonovich M, Hager G, Cole PA, Brady JN. 2002. Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Molecular and cellular biology* **22**: 4450-4462.
- Lu H, Pise-Masison CA, Linton R, Park HU, Schiltz RL, Sartorelli V, Brady JN. 2004. Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Journal of virology* **78**: 6735-6743.
- Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327**: 996-1000.

- Luczynski W, Kowalczyk O, Stasiak-Barmuta A, Ilendo E, Krawczuk-Rybak M, Chyczewski L. 2009. Acute lymphoblastic leukemia-derived dendritic cells express tumor associated antigens: PNPT1, PMPCB, RHAMM, BSG and ERCC1. *Neoplasma* **56**: 428-434.
- Macnamara A, Rowan A, Hilburn S, Kadolsky U, Fujiwara H, Suemori K, Yasukawa M, Taylor G, Bangham CR, Asquith B. 2010. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS pathogens* **6**: e1001117.
- Mahieux R, Gessain A. 2011. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* **3**: 1074-1090.
- Maiato H, Fairley EA, Rieder CL, Swedlow JR, Sunkel CE, Earnshaw WC. 2003. Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell* **113**: 891-904.
- Majerciak V, Pripuzova N, McCoy JP, Gao SJ, Zheng ZM. 2007. Targeted disruption of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 in the viral genome is detrimental for the expression of ORF59, K8alpha, and K8.1 and the production of infectious virus. *Journal of virology* **81**: 1062-1071.
- Majerciak V, Yamanegi K, Allemand E, Kruhlak M, Krainer AR, Zheng ZM. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 functions as a viral splicing factor and promotes expression of intron-containing viral lytic genes in spliceosome-mediated RNA splicing. *Journal of virology* **82**: 2792-2801.
- Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M. 2005. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene* **24**: 6016-6025.
- Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**: 449-459.
- Maniatis T, Tasic B. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**: 236-243.
- Manns A, Miley WJ, Wilks RJ, Morgan OS, Hanchard B, Wharfe G, Cranston B, Maloney E, Welles SL, Blattner WA et al. 1999. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *The Journal of infectious diseases* **180**: 1487-1493.
- Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, Hanchard B, Blattner WA. 1992. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *International journal of cancer Journal international du cancer* **51**: 886-891.
- Matsuoka E, Usuku K, Jonosono M, Takenouchi N, Izumo S, Osame M. 2000. CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *Journal of neuroimmunology* **102**: 1-7.

- Matsuoka M, Yasunaga J. 2013. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Current opinion in virology* **3**: 684-691.
- Mayr C, Bartel DP. 2009. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* **138**: 673-684.
- Mazurov D, Ilinskaya A, Heidecker G, Lloyd P, Derse D. 2010. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS pathogens* **6**: e1000788.
- McCracken S, Fong N, Rosonina E, Yankulov K, Brothers G, Siderovski D, Hessel A, Foster S, Shuman S, Bentley DL. 1997a. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* **11**: 3306-3318.
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M, Bentley DL. 1997b. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**: 357-361.
- McGarvey T, Rosonina E, McCracken S, Li Q, Arnaout R, Mientjes E, Nickerson JA, Awrey D, Greenblatt J, Grosveld G et al. 2000. The acute myeloid leukemia-associated protein, DEK, forms a splicing-dependent interaction with exon-product complexes. *J Cell Biol* **150**: 309-320.
- Meekings KN, Leipzig J, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. 2008. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS pathogens* **4**: e1000027.
- Mihaylova VT, Green AM, Khurgel M, Semmes OJ, Kupfer GM. 2008. Human T-cell leukemia virus I tax protein sensitizes p53-mutant cells to DNA damage. *Cancer research* **68**: 4843-4852.
- Millevoi S, Decorsiere A, Loulergue C, Iacovoni J, Bernat S, Antoniou M, Vagner S. 2009. A physical and functional link between splicing factors promotes pre-mRNA 3' end processing. *Nucleic acids research* **37**: 4672-4683.
- Millevoi S, Loulergue C, Dettwiler S, Karaa SZ, Keller W, Antoniou M, Vagner S. 2006. An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *The EMBO journal* **25**: 4854-4864.
- Mills AA. 2005. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes & development* **19**: 2091-2099.
- Misteli T, Caceres JF, Spector DL. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**: 523-527.
- Mocquet V, Neusiedler J, Rende F, Cluet D, Robin JP, Terme JM, Duc Dodon M, Wittmann J, Morris C, Le Hir H et al. 2012. The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein



- inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *Journal of virology* **86**: 7530-7543.
- Moisio AL, Jarvinen H, Peltomaki P. 2002. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. *Gut* **50**: 845-850.
- Mole S, McFarlane M, Chuen-Im T, Milligan SG, Millan D, Graham SV. 2009. RNA splicing factors regulated by HPV16 during cervical tumour progression. *The Journal of pathology* **219**: 383-391.
- Montes M, Becerra S, Sanchez-Alvarez M, Sune C. 2012a. Functional coupling of transcription and splicing. *Gene* **501**: 104-117.
- Montes M, Cloutier A, Sanchez-Hernandez N, Michelle L, Lemieux B, Blanchette M, Hernandez-Munain C, Chabot B, Sune C. 2012b. TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* **32**: 751-762.
- Morcock DR, Kane BP, Casas-Finet JR. 2000. Fluorescence and nucleic acid binding properties of the human T-cell leukemia virus-type 1 nucleocapsid protein. *Biochimica et biophysica acta* **1481**: 381-394.
- Mori N, Fujii M, Cheng G, Ikeda S, Yamasaki Y, Yamada Y, Tomonaga M, Yamamoto N. 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, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N. 1999. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **93**: 2360-2368.
- Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. 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.
- Morrison AA, Viney RL, Lodomery MR. 2008. The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochimica et biophysica acta* **1785**: 55-62.
- Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. 2003. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia* **17**: 26-38.
- Mortreux F, Leclercq I, Gabet AS, Leroy A, Westhof E, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. 2001. Somatic mutation in human T-cell leukemia virus type 1 provirus and flanking cellular sequences during clonal expansion in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 367-377.
- Mulloy JC, Kislyakova T, Cereseto A, Casareto L, LoMonico A, Fullen J, Lorenzi MV, Cara A, Nicot C, Giam C et al. 1998. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax



- abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *Journal of virology* **72**: 8852-8860.
- Murphy EL, Wilks R, Hanchard B, Cranston B, Figueroa JP, Gibbs WN, Murphy J, Blattner WA. 1996. A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *International journal of epidemiology* **25**: 1083-1089.
- Nagai M, Brennan MB, Sakai JA, Mora CA, Jacobson S. 2001. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* **98**: 1858-1861.
- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S et al. 1998. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of neurovirology* **4**: 586-593.
- Nakano K, Watanabe T. 2012. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Frontiers in microbiology* **3**: 330.
- Nakashima K, Kawakami A, Hida A, Yamasaki S, Nakamura H, Kamachi M, Miyashita T, Tanaka F, Izumi Y, Tamai M et al. 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.
- Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de The H, Pique C et al. 2006. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* **107**: 4021-4029.
- Nayler O, Stratling W, Bourquin JP, Stagljar I, Lindemann L, Jasper H, Hartmann AM, Fackelmayer FO, Ullrich A, Stamm S. 1998. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic acids research* **26**: 3542-3549.
- Negi LM, Talegaonkar S, Jaggi M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK. 2012. Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting. *Journal of drug targeting* **20**: 561-573.
- Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *The Journal of biological chemistry* **280**: 29653-29660.
- Neklason DW, Solomon CH, Dalton AL, Kuwada SK, Burt RW. 2004. Intron 4 mutation in APC gene results in splice defect and attenuated FAP phenotype. *Familial cancer* **3**: 35-40.
- Neto WK, Da-Costa AC, de Oliveira AC, Martinez VP, Nukui Y, Sabino EC, Sanabani SS. 2011. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Virology journal* **8**: 535.
- Neugebauer KM, Roth MB. 1997. Distribution of pre-mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes & development* **11**: 1148-1159.

- Ng PW, Iha H, Iwanaga Y, Bittner M, Chen Y, Jiang Y, Gooden G, Trent JM, Meltzer P, Jeang KT et al. 2001. Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Oncogene* **20**: 4484-4496.
- Nicot C, Dundr M, Johnson JM, Fullen JR, Alonzo N, Fukumoto R, Princler GL, Derse D, Misteli T, Franchini G. 2004. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nature medicine* **10**: 197-201.
- Nicot C, Mahieux R, Takemoto S, Franchini G. 2000a. Bcl-X(L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. *Blood* **96**: 275-281.
- Nicot C, Opavsky R, Mahieux R, Johnson JM, Brady JN, Wolff L, Franchini G. 2000b. Tax oncoprotein trans-represses endogenous B-myb promoter activity in human T cells. *AIDS research and human retroviruses* **16**: 1629-1632.
- Nogues G, Kadener S, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. 2002. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* **277**: 43110-43114.
- Oh U, Jacobson S. 2008. Treatment of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: toward rational targeted therapy. *Neurologic clinics* **26**: 781-797, ix-x.
- Oliere S, Hernandez E, Lezin A, Arguello M, Douville R, Nguyen TL, Olindo S, Panelatti G, Kazanji M, Wilkinson P et al. 2010. HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS pathogens* **6**: e1001177.
- Osorio FG, Navarro CL, Cadinanos J, Lopez-Mejia IC, Quiros PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzman G, Varela I et al. 2011. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science translational medicine* **3**: 106ra107.
- Owsianka AM, Patel AH. 1999. Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* **257**: 330-340.
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry* **55**: 1119-1150.
- Pagani F, Stuani C, Zuccato E, Kornblihtt AR, Baralle FE. 2003. Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *The Journal of biological chemistry* **278**: 1511-1517.
- Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI. 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine* **16**: 83-89.
- Pals ST, Koopman G, Heider KH, Griffioen A, Adolf GR, Van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Horst E. 1993. CD44 splice variants: expression during lymphocyte activation and tumor progression. *Behring Institute Mitteilungen*: 273-277.

- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* **40**: 1413-1415.
- Park HU, Jeong JH, Chung JH, Brady JN. 2004. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. *Oncogene* **23**: 4966-4974.
- Parker CE, Daenke S, Nightingale S, Bangham CR. 1992. Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. *Virology* **188**: 628-636.
- Patel SS, Pandey M, Nandakumar D. 2011. Dynamic coupling between the motors of DNA replication: hexameric helicase, DNA polymerase, and primase. *Current opinion in chemical biology* **15**: 595-605.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* **28**: 622-629.
- Pilkington GR, Majerciak V, Bear J, Uranishi H, Zheng ZM, Felber BK. 2012. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 is not a bona fide export factor. *Journal of virology* **86**: 13089-13094.
- Pinheiro SR, Lana-Peixoto MA, Proietti AB, Orefice F, Lima-Martins MV, Proietti FA. 1995. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Arquivos de neuro-psiquiatria* **53**: 777-781.
- Pique C, Jones KS. 2012. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Frontiers in microbiology* **3**: 378.
- Pise-Masison CA, Choi KS, Radonovich M, Dittmer J, Kim SJ, Brady JN. 1998a. Inhibition of p53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Journal of virology* **72**: 1165-1170.
- Pise-Masison CA, Mahieux R, Jiang H, Ashcroft M, Radonovich M, Duvall J, Guillerm C, Brady JN. 2000. Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **20**: 3377-3386.
- Pise-Masison CA, Radonovich M, Dohoney K, Morris JC, O'Mahony D, Lee MJ, Trepel J, Waldmann TA, Janik JE, Brady JN. 2009. Gene expression profiling of ATL patients: compilation of disease-related genes and evidence for TCF4 involvement in BIRC5 gene expression and cell viability. *Blood* **113**: 4016-4026.
- Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guillerm C, Gessain A, Brady JN. 2002. Transcription profile of cells infected with human T-cell

- leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer research* **62**: 3562-3571.
- Pise-Masison CA, Radonovich M, Sakaguchi K, Appella E, Brady JN. 1998b. Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *Journal of virology* **72**: 6348-6355.
- Ploner C, Kofler R, Villunger A. 2008. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S84-92.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 7415-7419.
- Portis T, Harding JC, Ratner L. 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.
- Pozzatti R, Vogel J, Jay G. 1990. The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Molecular and cellular biology* **10**: 413-417.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* **24**: 6058-6068.
- Rabaaoui S, Zouhiri F, Lancon A, Leh H, d'Angelo J, Wattel E. 2008. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit human T-cell leukemia virus type 1 early replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 3532-3541.
- Ramirez JA, Nyborg JK. 2007. Molecular characterization of HTLV-1 Tax interaction with the KIX domain of CBP/p300. *Journal of molecular biology* **372**: 958-969.
- Ratner L, Portis T, Robek M, Harding J, Grossman W. 2000. Studies of the immortalizing activity of HTLV type 1 Tax, using an infectious molecular clone and transgenic mice. *AIDS research and human retroviruses* **16**: 1647-1651.
- Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM et al. 2011. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* **117**: 4855-4859.
- Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. 1990. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology* **64**: 5682-5687.
- Riou P, Bex F, Gazzolo L. 2000. The human T cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein represses MyoD-dependent transcription by inhibiting MyoD-binding to the KIX domain of p300. A potential mechanism for Tax-mediated repression of the transcriptional activity of basic helix-loop-helix factors. *The Journal of biological chemistry* **275**: 10551-10560.

- Robek MD, Ratner L. 1999. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *Journal of virology* **73**: 4856-4865.
- Robson-Dixon ND, Garcia-Blanco MA. 2004. MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb. *The Journal of biological chemistry* **279**: 29075-29084.
- Rosonina E, Blencowe BJ. 2004. Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *RNA* **10**: 581-589.
- Roybal GA, Jurica MS. 2010. Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic acids research* **38**: 6664-6672.
- Ruckes T, Saul D, Van Snick J, Hermine O, Grassmann R. 2001. Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood* **98**: 1150-1159.
- Saggiaro D, Silic-Benussi M, Biasiotto R, D'Agostino DM, Ciminale V. 2009. Control of cell death pathways by HTLV-1 proteins. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 3338-3351.
- Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. 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.
- Sanchez G, Bittencourt D, Laud K, Barbier J, Delattre O, Auboeuf D, Dutertre M. 2008. Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6004-6009.
- Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. 2008. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* **320**: 1643-1647.
- Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H et al. 2005. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* **105**: 1204-1213.
- Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. 2012. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* **9**: 46.
- Schmidt U, Basyuk E, Robert MC, Yoshida M, Villemin JP, Auboeuf D, Aitken S, Bertrand E. 2011. Real-time imaging of cotranscriptional splicing reveals a kinetic model that reduces noise: implications for alternative splicing regulation. *The Journal of cell biology* **193**: 819-829.

- Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Allo M, Kornblihtt AR. 2009. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 4325-4330.
- Schwartz S, Meshorer E, Ast G. 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature structural & molecular biology* **16**: 990-995.
- Sebastian S, Faralli H, Yao Z, Rakopoulos P, Pali C, Cao Y, Singh K, Liu QC, Chu A, Aziz A et al. 2013. Tissue-specific splicing of a ubiquitously expressed transcription factor is essential for muscle differentiation. *Genes & development* **27**: 1247-1259.
- Seiki M, Inoue J, Hidaka M, Yoshida M. 1988. Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 7124-7128.
- Seiki M, Inoue J, Takeda T, Hikikoshi A, Sato M, Yoshida M. 1985. The p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting activator of viral gene transcription. *Japanese journal of cancer research : Gann* **76**: 1127-1131.
- Semmes OJ, Jeang KT. 1996. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *Journal of virology* **70**: 6347-6357.
- Shi Y. 2012. Alternative polyadenylation: new insights from global analyses. *RNA* **18**: 2105-2117.
- Shirinian M, Kfoury Y, Dassouki Z, El-Hajj H, Bazarbachi A. 2013. Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF-kappaB activation. *Frontiers in microbiology* **4**: 231.
- Sibon D, Gabet AS, Zandecki M, Pinatel C, Thete J, Delfau-Larue MH, Rabaaoui S, Gessain A, Gout O, Jacobson S et al. 2006. HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. *The Journal of clinical investigation* **116**: 974-983.
- Sibon D, Zane L, Idrissi ME, Delfau-Larue MH, Gessain A, Gout O, Mortreux F, Wattel E. 2013. Mosaicism of HTLV-1 5' LTR CpG methylation in the absence of malignancy. *Virus research* **178**: 452-461.
- Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes & development* **18**: 2437-2468.
- Singh R, Valcarcel J. 2005. Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**: 645-653.



- Sinha-Datta U, Horikawa I, Michishita E, Datta A, Sigler-Nicot JC, Brown M, Kazanji M, Barrett JC, Nicot C. 2004. Transcriptional activation of hTERT through the NF-kappaB pathway in HTLV-I-transformed cells. *Blood* **104**: 2523-2531.
- Sleeman J, Moll J, Sherman L, Dall P, Pals ST, Ponta H, Herrlich P. 1995. The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer. *Ciba Foundation symposium* **189**: 142-151; discussion 151-146, 174-146.
- Smith MR, Greene WC. 1991. Type I human T cell leukemia virus tax protein transforms rat fibroblasts through the cyclic adenosine monophosphate response element binding protein/activating transcription factor pathway. *The Journal of clinical investigation* **88**: 1038-1042.
- Soares LM, Zanier K, Mackereth C, Sattler M, Valcarcel J. 2006. Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. *Science* **312**: 1961-1965.
- Stewart SA, Feuer G, Jewett A, Lee FV, Bonavida B, Chen IS. 1996. HTLV-1 gene expression in adult T-cell leukemia cells elicits an NK cell response in vitro and correlates with cell rejection in SCID mice. *Virology* **226**: 167-175.
- Sugahara K, Yamada Y, Hiragata Y, Matsuo Y, Tsuruda K, Tomonaga M, Maeda T, Atogami S, Tsukasaki K, Kamihira S. 1997. Soluble and membrane isoforms of Fas/CD95 in fresh adult T-cell leukemia (ATL) cells and ATL-cell lines. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **72**: 128-132.
- Suzuki T, Uchida-Toita M, Andoh T, Yoshida M. 2000. HTLV-1 tax oncoprotein binds to DNA topoisomerase I and inhibits its catalytic activity. *Virology* **270**: 291-298.
- Tabakin-Fix Y, Azran I, Schavinky-Khrapunsky Y, Levy O, Aboud M. 2006. Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. *Carcinogenesis* **27**: 673-681.
- Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y, Matsuoka M. 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **109**: 559-567.
- Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S et al. 2011. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* **478**: 127-131.
- Tattermusch S, Skinner JA, Chaussabel D, Banchereau J, Berry MP, McNab FW, O'Garra A, Taylor GP, Bangham CR. 2012. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS pathogens* **8**: e1002480.
- Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. 1995. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nature genetics* **9**: 184-190.

- Tian B, Pan Z, Lee JY. 2007. Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome research* **17**: 156-165.
- Tie F, Adya N, Greene WC, Giam CZ. 1996. Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. *Journal of virology* **70**: 8368-8374.
- Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, Sammeth M, Beato M, Valcarcel J, Guigo R. 2009. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature structural & molecular biology* **16**: 996-1001.
- Tonegawa S, Brack C, Hozumi N, Pirrotta V. 1978. Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **42 Pt 2**: 921-931.
- Toyoshima H, Itoh M, Inoue J, Seiki M, Takaku F, Yoshida M. 1990. Secondary structure of the human T-cell leukemia virus type 1 rex-responsive element is essential for rex regulation of RNA processing and transport of unspliced RNAs. *Journal of virology* **64**: 2825-2832.
- Tsukahara T, Kannagi M, Ohashi T, Kato H, Arai M, Nunez G, Iwanaga Y, Yamamoto N, Ohtani K, Nakamura M et al. 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. *Journal of virology* **73**: 7981-7987.
- Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington W, Jr., O'Mahony D, Janik JE, Bittencourt AL, Taylor GP et al. 2009. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 453-459.
- Tsukasaki K, Tanosaki S, DeVos S, Hofmann WK, Wachsman W, Gombart AF, Krebs J, Jauch A, Bartram CR, Nagai K et al. 2004. Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia/lymphoma by using oligonucleotide microarrays. *International journal of cancer Journal international du cancer* **109**: 875-881.
- Uchida N, Otsuka T, Arima F, Shigematsu H, Fukuyama T, Maeda M, Sugio Y, Itoh Y, Niho Y. 1999. Correlation of telomerase activity with development and progression of adult T-cell leukemia. *Leukemia research* **23**: 311-316.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**: 481-492.
- Usui T, Yanagihara K, Tsukasaki K, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. 2008. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* **5**: 34.
- van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooi AJ, Goemans NM et al. 2007. Local dystrophin



- restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *The New England journal of medicine* **357**: 2677-2686.
- Vargas DY, Shah K, Batish M, Levandoski M, Sinha S, Marras SA, Schedl P, Tyagi S. 2011. Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell* **147**: 1054-1065.
- Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet infectious diseases* **7**: 266-281.
- Verma D, Bais S, Gaillard M, Swaminathan S. 2010. Epstein-Barr Virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *Journal of virology* **84**: 11781-11789.
- Verma D, Swaminathan S. 2008. Epstein-Barr virus SM protein functions as an alternative splicing factor. *Journal of virology* **82**: 7180-7188.
- Villaudy J, Wencker M, Gadot N, Gillet NA, Scoazec JY, Gazzolo L, Manz MG, Bangham CR, Dodon MD. 2011. HTLV-1 propels thymic human T cell development in "human immune system" Rag2(-)/(-) gamma c(-)/(-) mice. *PLoS pathogens* **7**: e1002231.
- Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701-718.
- Waldholm J, Wang Z, Brodin D, Tyagi A, Yu S, Theopold U, Farrants AK, Visa N. 2011. SWI/SNF regulates the alternative processing of a specific subset of pre-mRNAs in *Drosophila melanogaster*. *BMC molecular biology* **12**: 46.
- Wallach-Dayana SB, Grabovsky V, Moll J, Sleeman J, Herrlich P, Alon R, Naor D. 2001. CD44-dependent lymphoma cell dissemination: a cell surface CD44 variant, rather than standard CD44, supports in vitro lymphoma cell rolling on hyaluronic acid substrate and its in vivo accumulation in the peripheral lymph nodes. *Journal of cell science* **114**: 3463-3477.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**: 470-476.
- Wang H, Machesky NJ, Mansky LM. 2004. Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *Journal of virology* **78**: 1503-1512.
- Wang SJ, Bourguignon LY. 2011. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *The American journal of pathology* **178**: 956-963.
- Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. 2009. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *The Laryngoscope* **119**: 1518-1530.

- Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, Saito Y, Kawano Y, Hidaka T, Yamashita K, Umeki K, Taki T, Taniwaki M et al. 2010. Downregulation of CDKN1A in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. *Journal of virology* **84**: 6966-6977.
- Watanabe T, Seiki M, Hirayama Y, Yoshida M. 1986. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* **148**: 385-388.
- Watanabe T, Seiki M, Yoshida M. 1984. HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology* **133**: 238-241.
- Watermann DO, Tang Y, Zur Hausen A, Jager M, Stamm S, Stickeler E. 2006. Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene. *Cancer research* **66**: 4774-4780.
- Wattel E, Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S. 1996. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* **13 Suppl 1**: S92-99.
- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. 1995. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of virology* **69**: 2863-2868.
- Weil R, Levraud JP, Dodon MD, Bessia C, Hazan U, Kourilsky P, Israel A. 1999. Altered expression of tyrosine kinases of the Src and Syk families in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines. *Journal of virology* **73**: 3709-3717.
- Weimann TK, Wagner C, Goos M, Wagner SN. 2003. CD44 variant isoform v10 is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes and mediates hyaluronan-independent heterotypic cell-cell adhesion to melanoma cells. *Experimental dermatology* **12**: 204-212.
- Whistler T, Chiang CF, Lonergan W, Hollier M, Unger ER. 2010. Implementation of exon arrays: alternative splicing during T-cell proliferation as determined by whole genome analysis. *BMC genomics* **11**: 496.
- Wiktor SZ, Pate EJ, Rosenberg PS, Barnett M, Palmer P, Medeiros D, Maloney EM, Blattner WA. 1997. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *Journal of human virology* **1**: 37-44.
- Will CL, Luhrmann R. 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. 2013. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Experimental biology and medicine* **238**: 324-338.

- Winter HY, Marriott SJ. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *Journal of virology* **81**: 6089-6098.
- Wong J. 2013. Altered expression of RNA splicing proteins in Alzheimer's disease patients: evidence from two microarray studies. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra* **3**: 74-85.
- Wu K, Bottazzi ME, de la Fuente C, Deng L, Gitlin SD, Maddukuri A, Dadgar S, Li H, Vertes A, Pumfery A et al. 2004. Protein profile of tax-associated complexes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 495-508.
- Xerri L, Hassoun J, Devilard E, Birnbaum D, Birg F. 1998. BCL-X and the apoptotic machinery of lymphoma cells. *Leukemia & lymphoma* **28**: 451-458.
- Xiao G, Cvijic ME, Fong A, Harhaj EW, Uhlik MT, Waterfield M, Sun SC. 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.
- Xing Y, Yang Y, Zhou F, Wang J. 2013. Characterization of genome-wide binding of NF-kappaB in TNFalpha-stimulated HeLa cells. *Gene* **526**: 142-149.
- Yamano Y, Cohen CJ, Takenouchi N, Yao K, Tomaru U, Li HC, Reiter Y, Jacobson S. 2004. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A\*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *The Journal of experimental medicine* **199**: 1367-1377.
- Yamaoka S, Inoue H, Sakurai M, Sugiyama T, Hazama M, Yamada T, Hatanaka M. 1996. Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *The EMBO journal* **15**: 873-887.
- Yang L, Kotomura N, Ho YK, Zhi H, Bixler S, Schell MJ, Giam CZ. 2011. Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *Journal of virology* **85**: 3001-3009.
- Yang Q, Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Zhang SL. 2004. Cloning and identification of NS5ATP2 gene and its spliced variant transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A. *World journal of gastroenterology : WJG* **10**: 1735-1739.
- Yasunaga J, Matsuoka M. 2007. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **14**: 133-140.
- Yeo G, Burge CB. 2004. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* **11**: 377-394.

- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 2031-2035.
- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J, Fujisawa J, Matsuoka M. 2008. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *Journal of virology* **82**: 9359-9368.
- Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D, Hieshima K, Tatsumi Y, Matsushima K, Hasegawa H et al. 2002. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* **99**: 1505-1511.
- Youn HG, Matsumoto J, Tanaka Y, Shimotohno K. 2003. SR-related protein TAXREB803/SRL300 is an important cellular factor for the transactivational function of human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Journal of virology* **77**: 10015-10027.
- Zane L, Sibon D, Capraro V, Galia P, Karam M, Delfau-Larue MH, Gilson E, Gessain A, Gout O, Hermine O et al. 2012. HTLV-1 positive and negative T cells cloned from infected individuals display telomerase and telomere genes deregulation that predominate in activated but untransformed CD4+ T cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* **131**: 821-833.
- Zane L, Sibon D, Jeannin L, Zandecki M, Delfau-Larue MH, Gessain A, Gout O, Pinatel C, Lancon A, Mortreux F et al. 2010a. Tax gene expression and cell cycling but not cell death are selected during HTLV-1 infection in vivo. *Retrovirology* **7**: 17.
- Zane L, Sibon D, Legras C, Lachuer J, Wierinckx A, Mehlen P, Delfau-Larue MH, Gessain A, Gout O, Pinatel C et al. 2010b. Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8+ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* **407**: 341-351.
- Zane L, Sibon D, Mortreux F, Wattel E. 2009. Clonal expansion of HTLV-1 infected cells depends on the CD4 versus CD8 phenotype. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 3935-3941.
- Zhang J, Yamada O, Kida S, Matsushita Y, Yamaoka S, Chagan-Yasutan H, Hattori T. 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 W, Nisbet JW, Albrecht B, Ding W, Kashanchi F, Bartoe JT, Lairmore MD. 2001. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *Journal of virology* **75**: 9885-9895.
- Zhang Z, Swindle CS, Bates JT, Ko R, Cotta CV, Klug CA. 2007. Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice. *Blood* **109**: 2190-2197.

- Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. 2009. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* **113**: 2755-2764.
- Zhi H, Yang L, Kuo YL, Ho YK, Shih HM, Giam CZ. 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 M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R, Brady JN. 2006. Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *Journal of virology* **80**: 4781-4791.
- Zoller M. 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature reviews Cancer* **11**: 254-267.
- Zou Z, Huang B, Wu X, Zhang H, Qi J, Bradner J, Nair S, Chen LF. 2013. Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA. *Oncogene*.

## RESUME

Le virus T lymphotrope humain HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL) et de nombreuses maladies inflammatoires. Depuis les premières approches moléculaires des mécanismes mis en jeu dans la physiopathologie de l'infection, HTLV-1 est associée à de nombreuses modifications quantitatives de l'expression des gènes cellulaires. A ce jour, ces modifications ont été décrites essentiellement à l'échelle transcriptionnelle à travers notamment les effets de l'oncoprotéine virale Tax, et plus récemment HBZ, sur l'activité de nombreux facteurs de transcription et de remodelage de la chromatine. Outre leurs impacts sur les niveaux d'activité des promoteurs, certains facteurs de transcription apparaissent jouer également un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif des transcrits primaires. Ce mécanisme essentiel à la diversité du transcriptome et du protéome cellulaire, apparaît étroitement couplé à la transcription et ses dérégulations sont de plus en plus décrites dans les phénomènes cytotoxiques et pathogènes tels que les infections et les cancers.

Dans ce contexte, mon travail s'est intéressé en premier lieu à caractériser les profils d'expression des exons des cellules T CD4+ infectées ou non, et transformées ou non par HTLV-1 *in vivo*. Mes résultats démontrent que HTLV-1 induit des modifications de l'épissage alternatif qui permettent de distinguer les cellules T infectées non-transformées des cellules d'ATLL. Ces réarrangements d'épissage affectaient des gènes engagés dans des voies fonctionnelles distinctes de celles affectées par les modifications transcriptionnelles, révélant de nouvelles voies d'investigations pour la compréhension des mécanismes de l'infection.

Dans une seconde étude, j'ai abordé les aspects mécanistiques des modifications d'épissage alternatif par HTLV-1. Mes données montrent que, outre ses effets sur la régulation quantitative de l'expression des gènes cellulaires, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'oncogène Tax est impliquée dans une reprogrammation de l'épissage alternatif de nombreux gènes. Plus particulièrement, mes travaux ont précisé que l'apparition du variant d'épissage CD44v10 dans les cellules exprimant Tax résultait d'un enrichissement de l'ARN polymérase II dans les régions variables du gène CD44 de façon NF- $\kappa$ B dépendant.

Ces données révèlent un nouveau degré de complexité dans les mécanismes de dérégulation de l'expression des gènes cellulaires par HTLV-1 et ouvre de nouvelles perspectives d'investigations dans la compréhension des processus leucémogènes associés à l'infection par le virus HTLV-1.

Mots clés : HTLV-1, épissage alternatif, Tax, NF- $\kappa$ B, ARN polymérase II.