



Rôle des protéines AID et Bfl-1 dans les processus d'instabilité génomique et de survie cellulaire induits par l'oncoprotéine Tax au cours de la lymphomagenèse associée à l'infection par HTLV-1

Aurélien Riquet

► To cite this version:

Aurélien Riquet. Rôle des protéines AID et Bfl-1 dans les processus d'instabilité génomique et de survie cellulaire induits par l'oncoprotéine Tax au cours de la lymphomagenèse associée à l'infection par HTLV-1. Bactériologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10263 . tel-01134631

HAL Id: tel-01134631

<https://theses.hal.science/tel-01134631>

Submitted on 24 Mar 2015

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.



N° d'ordre : 263 - 2014

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

**Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

*soutenue publiquement le 28 novembre 2014
par*

Monsieur Aurélien RIQUET

TITRE :

**ROLE DES PROTEINES AID ET BFL-1 DANS LES PROCESSUS
D'INSTABILITE GENOMIQUE ET DE SURVIE CELLULAIRE INDUITS
PAR L'ONCOPROTEINE TAX AU COURS DE LA LYMPHOMAGENESE
ASSOCIEE A L'INFECTION PAR HTLV-1.**

Directeur de thèse :
Nathalie BONNEFOY

JURY :
Madame Anne DURANDY, Rapporteur
Madame Claudine PIQUE, Rapporteur
Monsieur Jean-Pierre VARTANIAN, Examineur
Monsieur Mathias FAURE, Examineur et Président du jury
Madame Nathalie BONNEFOY, Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Nathalie Bonnefoy de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Merci pour ces discussions scientifiques, ton analyse, ta capacité rédactionnelle qui m'ont tant aidé et ton franc parlé. Merci de m'avoir ouvert ta maison pour mes manips à Montpellier.

Je remercie chaleureusement tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie Anne Durandy et Claudine Pique pour leur lecture attentive et critique de mon manuscrit. Je remercie Jean-Pierre Vartanian et Mathias Faure pour leur participation au jury de ma soutenance de thèse.

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité INSERM U851 « Immunité Infection Vaccination » qui s'est transformée entre temps en un centre international de recherche en infectiologie, le CIRI. Merci à toi Jacqueline Marvel de m'avoir accueillie au sein de ton unité puis au sein de ton équipe au cours de ma thèse quand j'en ai eu besoin.

Je remercie la Ligue Nationale Contre le Cancer sans qui je n'aurais pu faire cette thèse. Ils ont financé mon salaire ainsi que mes travaux de recherche et pour cela je leur suis infiniment reconnaissant

A l'équipe NBB...

Je remercie toute l'ancienne équipe NBB pour son accueil, moi seul mâle perdu au milieu de tant de femmes. Un grand merci à Anne-Laure, Anne et Marie-Laure de m'avoir accueilli et aider dans mon apprentissage de la science ainsi que pour les discussions parfois... souvent légères, qui permettaient de rendre la journée plus agréable. Je voudrais remercier plus particulièrement Héloïse Macaire avec qui j'ai travaillé pendant un an sur son projet de thèse qui est devenu notre projet. J'ai énormément appris à tes côtés, tu m'as aidé, formé, fait confiance. Merci

Hélène... Toi ma tutrice de M2, ma mère adoptive au laboratoire. Tu m'as appris la science, pas seulement les manips mais la réflexion, l'analyse, la lecture critique. Est-il possible de rencontrer une personne plus généreuse que toi... Tu as toujours su écouter, trouver les mots juste, voir du positif même quand j'échouais et me donner l'envie de continuer et de progresser. Quel grand manager tu ferais si tu te lançais. Que dire de nos fous rires et de nos discussions interminables... une vraie bouffée d'oxygène.

Aux membres de l'équipe Marvel...

Merci à vous et surtout à toi Jacqueline de m'avoir accueilli, moi l'orphelin sans équipe, sans paillasse. Tu m'as permis de poursuivre ma thèse dans les meilleures conditions possibles. Merci à tous les membres de l'équipe, Yann, Christophe, Martine, Peggy, Emilie, Morgan, Julien et plus récemment Mélanie. Merci pour vos conseils, pour votre aide, pour les discussions scientifiques... ou pas... je ne parlais pas des objets et photos retrouvés régulièrement sur vos bureaux et ordi qui avaient cet effet incroyable de rendre la journée plus funky.

Sophia, merci. Merci pour ces fous rires et ces longs bavardages, merci pour les craquages, les anecdotes, tes liens que tu envoies par mail, d'une science somme toute relative.

Marie-Cécile... Toi... Ces années passées dans ce bureau commun n'auraient pas été les mêmes sans toi, de confidences en fous rires, nos échanges ont été des moments précieux de détente et de légèreté, nos longues conversations passées à refaire le monde... scientifique, une vraie pause. Merci

Aux membres de la tour CERVI...

Merci à vous tous pour votre bonne humeur, votre présence, nos conversations pas du tout scientifiques et les soirées passées à visiter les bars. Merci à Steph, Denitsa, Ludo, Laurent, Morgan, Bertrand, Clémence, Claire, Mélanie et j'en passe, la liste serait trop longue...

Un Merci spéciale à Renaud qui est devenu un ami, qui a toujours été là aussi bien au labo qu'en dehors.

Merci également à Colinne d'avoir été là et d'avoir échangé tant de fous rires lors de nos pauses café et de nos soirées...

Merci à Laurent, Grand Sboub (Morgan), Bertrand et Ludo pour nos soirées inoubliables. Ludo gare aux photos qui surgissent parfois pour les thèses ;)

Anais, Véro, Céline, Alex, Emilie et François... mes secrétaires préférés... avec qui d'autres aurais-je pu partager mes repas... si variés... avec qui d'autres échanger les conversations et engueulades que nous avons eu. Merci à vous les filles (oui François, depuis que je t'ai vu avec cette perruque blonde tu es aussi un peu une fille), merci d'avoir été là, de m'avoir soutenue, poussé, engueulé, encouragé et de m'avoir fait rire... même si c'est souvent moi qui vous faisais rire.

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

Je remercie également tout le personnel de l'Unité U1111-CIRI et des plateaux techniques pour leur accueil, leur aide précieuse et la qualité de l'environnement scientifique qu'ils m'ont apportée au cours de cette thèse. Un grand merci en particulier à Bariza Blanquier, Annie Chaboud, Sébastien Dussurgey, Thibault Andrieu (notre Mac Lesggy).

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible, les soirées passées à décompresser, les vacances au ski, ou à Ibiza... mais chuttt, ce qui se passe à Ibiza reste à Ibiza, n'est-ce pas Yanou ;)

Je ne m'épencherai pas sur tous nos moments passés dans ce manuscrit, mais chacun sait à quel point il compte.

Maman, Papa, Schtrumpfette, vous le savez, les mots ne sont pas ma spécialité mais heureusement en science on a les chiffres... je vous aime ∞^{+++}

Table des matières :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. ACTIVATION-INDUCED CYTIDINE DEAMINASE (AID)	19
1.1. Mécanisme d'action de AID.....	21
1.1.1. Le modèle d'édition de l'ARN.....	21
1.1.2. Le modèle de la désamination de l'ADN simple brin	22
1.2. Mise en évidence du rôle de AID dans les processus de SHM et de CSR.....	25
1.2.1. Le processus d'hypermutation somatique	26
1.2.2. La commutation isotypique.....	31
1.3. Un rôle en dehors de cellules du système immunitaire : la déméthylation de l'ADN.....	35
1.4. Régulation de l'expression de AID	38
1.4.1. Régulation transcriptionnelle	39
1.4.1.1. La voie NF-kB	39
1.4.1.1. cis-régulation de la transcription de <i>aicda</i>	41
1.4.1.2. Blimp-1, un répresseur de la transcription de AID.....	43
1.4.2. Régulation post-transcriptionnelle de AID par les MicrosARNs	43
1.5. Régulation post-traductionnelle de la fonction de AID	44
1.5.1. Régulation de la localisation	45
1.5.2. Phosphorylation de AID	46
1.5.3. Co-facteurs de AID	47
1.1. Rôle de AID dans l'instabilité génétique et la tumorigenèse	52
1.1.1. AID et hémopathies malignes B.....	52
1.1.2. Cancers associés à des inflammations chroniques	55
1.1.2.1. Colitis-associated colorectal cancer	56
1.1.2.2. Hépatocarcinome.....	58
1.1.2.3. Cancer gastrique	59
1.1.2.4. Cholangiocarcinome	61
1.1.2.5. Lymphomes T	62
2. HTLV-1 UNE BOMBE A RETARDEMENT.....	65
2.1. Généralités	67
2.2. Epidémiologie : HTLV-1 et potentiel oncogénique.....	69
2.2.1. TSP/HAM	71
2.2.2. L'ATL	72
2.3. Tax: Une protéine au cœur du processus leucémogène.....	76
2.3.1. Tax une protéine oncogénique capable d'interagir avec un grand nombre de partenaires cellulaires.	77
2.3.1.1. Tax une protéine au pouvoir oncogénique.....	77
2.3.1.2. Activation et importance de la voie NF-kB dans la transformation cellulaire induite par Tax.	

2.3.1.3.	Tax : prolifération des cellules T et perte du contrôle du cycle cellulaire	83
2.3.1.3.1.	Modulation de l'expression de cytokines et/ou de leur récepteurs par Tax : conséquence sur la prolifération et la modulation de la réponse immunitaire.....	83
2.3.1.3.2.	Tax perturbe le cycle cellulaire en inhibant les protéines impliquées dans les points de contrôles.	84
2.3.1.4.	Tax favorise la mutagenèse.....	89
2.3.1.4.1.	Tax favorise la transformation cellulaire en inhibant les voies de réparation de l'ADN.	90
2.3.1.4.2.	Tax induit directement des mutations au niveau de l'ADN	94
3.	DEREGULATION DE L'APOPTOSE ET PERSISTANCE DES DOMMAGES A L'ADN : IMPLICATION DE BFL-1.....	97
3.1.	<i>L'apoptose, un mécanisme essentiel à l'homéostasie cellulaire.....</i>	97
3.1.1.	Les membres de la famille Bcl-2	101
3.1.1.1.	Jeu d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2.....	102
3.1.1.2.	Dérégulation de l'expression de la famille Bcl-2, résistance à l'apoptose et chimiorésistance	104
3.1.1.3.	Modulation de l'expression de Bfl-1 par Tax.....	105
RESULTATS		107
4.	CONTEXTE DES TRAVAUX DE THESE ET RESULTATS PRINCIPAUX.....	108
4.1.	<i>Article 1 : Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase.....</i>	108
4.1.1.	Principaux résultats.....	108
4.1.2.	Article 1 : Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase.....	113
4.1.3.	Article.....	114
4.1.4.	Résultats complémentaires	156
4.1.4.1.	AID induit l'expression des ligands de NKG2D dans les LT CD4 ⁺ infectés.	156
4.1.4.2.	Twist-1 est exprimé dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.	157
4.1.4.3.	Twist-1 est exprimé dans LT CD4 ⁺ infectés par HTLV-1	159
4.1.4.4.	L'inhibition de l'expression de Twist-1 dans LT CD4 ⁺ infectés par HTLV-1 n'affecte pas l'expression de AID	161
4.2.	<i>Article 2 : Tax-induced expression of the anti-apoptotic bfl-1 protein contributes to survival of HTLV-1-infected t-cells</i>	162
4.2.1.	Principaux résultats.....	162
4.3.	<i>Article 2 : Tax protein-induced expression of antiapoptotic Bfl-1 protein contributes to survival of HTLV-1-infected T-cells.....</i>	166
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		186
1.	IMPLICATION DE AID DANS LES DOMMAGES A L'ADN INDUIT PAR TAX DANS LES LT CD4 ⁺	187
1.1.	<i>Edition de l'ADN génomique par AID dans les LT CD4⁺ infectés par HTLV-1 ..</i>	187

1.2. Implication de AID dans les cassures d'ADN et l'instabilité génomique des cellules infectées	190
1.3. Un rôle de AID dans l'immunogénicité des cellules infectées.	192
1.4. Implication de Twist-1 la persistance des dommages à l'ADN et la prolifération des cellules infectées.....	194
1.5. Implication de Tax et d'autres facteurs tel que HBZ dans la régulation de l'expression de AID.....	196
2. IMPLICATION DE BFL-1 DANS LA SURVIE DES CELLULES INFECTÉES ET LA CHIMIORESISTANCE.	198
2.1. HBZ module l'expression de Bfl-1 induite par Tax.....	198
2.2. Bfl-1 promeut la survie des cellules infectées par HTLV-1.....	201
2.3. Bfl-1 pourrait être impliquée dans la chimiorésistance des formes agressives d'ATL.....	202
3. MODELE PRESENTANT LE ROLE DE AID ET BFL-1 DANS L'INSTABILITE GENOMIQUE ET LA SURVIE INDUITE PAR TAX AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ATL.	205
ANNEXES.....	207
4. ARTICLE 3 : THE EMERGING ROLE OF TWIST1 AND TWIST2 IN LYMPHOCYTES AND HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES.....	208
BIBLIOGRAPHIE	221

Table des figures :

<i>Figure 1 : Structure et fonction des membres de la famille AID/APOBEC humains..</i>	18
<i>Figure 2 : Schéma de la structure primaire de AID et mutations affectant les processus de SHM et CSR.....</i>	24
<i>Figure 3 : Voies de réparations impliquées dans la SHM.</i>	28
<i>Figure 4 : Schéma du processus de CSR vers l'isotype IgE.</i>	30
<i>Figure 5 : Voies de réparation impliquées dans la CSR.</i>	34
<i>Figure 6 : Mécanisme de déméthylation de l'ADN impliquant AID.</i>	36
<i>Figure 7 : Régulation de la transcription de aicda.</i>	40
<i>Figure 8 : co-facteurs régulant l'activité de AID au niveau de l'ADNsb.....</i>	48
<i>Figure 9 : Schéma bilan de la régulation de l'expression et de l'activité de AID.....</i>	50
<i>Figure 10 : Cellules d'ATL en forme de « flower cells ».</i>	64
<i>Figure 11 : Schéma de l'organisation génomique de HTLV-1 et de ses transcrits.....</i>	66
<i>Figure 12 : Prévalence de HTLV-1 dans le monde.</i>	68
<i>Figure 13 : Modèle du développement de l'ATL.</i>	74
<i>Figure 14 : Schéma de l'activation de la voie classique de NF-κB.....</i>	80
<i>Figure 15 : Modulation de la voie NF-κB par la protéine virale Tax.....</i>	82
<i>Figure 16 : Modulation du cycle cellulaire par Tax.</i>	86
<i>Figure 17 : Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque régulant l'apoptose.</i>	98
<i>Figure 18 : Structure primaire des différents membres de la famille Bcl-2..</i>	100
<i>Figure 19 : Jeu d'interactions entre les membres pro- et anti-apoptotique de la famille Bcl-2 dans les cellules saines et les cellules cancéreuses.</i>	103
<i>Figure 20 : Schéma du principe de la technique basée sur le FRET.</i>	109
<i>Figure 21 : Expression des ligands de NKG2D dans les LT CD4+ infectés par HTLV-1.</i>	156
<i>Figure 22 : Expression des transcrits de Twist-1 dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.</i>	158
<i>Figure 23 : Twist-1 est exprimé dans les LT CD4+ primaires infectés par HTLV-1.</i>	160
<i>Figure 24 : Twist-1 ne module pas l'expression de AID dans les Molt4-Tax.</i>	161
<i>Figure 25 : Principe de la Technique de 3D PCR.....</i>	188
<i>Figure 26 : Modèle présentant le rôle de AID et BFL-1 dans l'instabilité génomique et la survie induite par Tax au cours du développement de l'ATL.....</i>	206
 <i>Tableau 1 : Membres de la famille AID/APOBEC.....</i>	 20
<i>Tableau 2 : Pathologies associées à l'infection par HTLV-1.....</i>	 70

ABBREVIATIONS :

5-meC	5-Methylcytosine
γ H2AX	forme phosphorylée de l'histone H2AX
53BP1	p53 Binding Protein 1
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AID/ <i>aicda</i>	Activation-Induced Cytidine Deaminase
AP-1	Activator protein 1
APAF-1	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme
ATL	Adult T-cell Leukemia/Lymphoma
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-cell Receptor
BER	Base Excision Repair
Bfl-1	Bcl-2 fetal liver
BL	Lymphome de Burkitt
CBP	CREB-Binding Protein
CSR	Class Switch Recombination (Commutation isotypique)
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTNBL-1	Catenin beta like 1
DC	Dendritic Cell
DLBCL	Lymphome diffus à large cellules B
DSB	cassure double brin
EBV	Epstein-Barr Virus
FL	Lymphome Folliculaire
GC	Centre Germinatif
HBZ	HTLV-1 bZIP Factor
HIGMII	Syndrome de l'hyper IgM de type 2
HIV	Human Immunodeficiency Virus/Virus de l'Immunodéficience Humaine
HLA	Human Leucocyte Antigen
HoxC4	Homeobox C4
HTLV-1	Human T-cell Leukemia Virus type 1/ Virus T-Lymphotrope Humain de type-1
Ig	Immunoglobuline

I κ B	Inhibitor of κ B
IKK	I κ B Kinase
NF- κ B	Nuclear Factor KappaB
NEMO	NF- κ B Essential MOdulator
NHEJ	Non-Homologous End Joining
PKA	Protein Kinase A
RPA	Replication Protein A
ROS	Reactive oxygen species (Radicaux libre d'oxygène)
SHM	Hypermutation somatique
SSB	cassure simple brin
TSP/HAM	Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy
UNG	Uracil DNA glycosylase

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La relation hôte-pathogène est en perpétuelle évolution. L'agent pathogène et le système immunitaire humain se livrent à une véritable course contre la montre, le premier usant de toutes les stratégies possibles pour échapper au deuxième, le second s'adaptant sans cesse à cette évolution pour lutter efficacement contre cet agresseur étranger. Un des acteurs majeurs du système immunitaire adaptatif est la cellule B ou lymphocyte B (LB). Ce dernier a la capacité de détecter les agents pathogènes tels que les bactéries ou les virus présents dans les liquides humains (sang ou lymphe) et de sécréter des immunoglobulines (Ig) circulantes, ou anticorps (Ac) afin de neutraliser les agents pathogènes en formant un complexe immun, qui sera reconnu par d'autres cellules du système immunitaire et éliminé. Chaque LB possède à sa surface une immunoglobuline membranaire qui va reconnaître un motif unique bien précis appelé épitope de l'antigène. Le LB ainsi sélectionné et activé va produire des Ac identiques à l'Ig membranaire. L'évolution constante des agents pathogènes, l'émergence de nouveaux virus sont autant de challenges pour le système immunitaire qui devra évoluer pour s'adapter à ces nouvelles menaces.

Afin de s'adapter et de lutter efficacement les LB vont être capable de générer un répertoire Ac incroyablement diversifié. Les Ac possèdent une région variable appelée paratope qui va reconnaître l'antigène et une région constante qui détermine la classe de l'anticorps (M, D, A, G ou E) qui va interagir avec d'autres composantes du système immunitaire. Au cours du développement du LB dans la moelle osseuse, la région variable de l'Ac est assemblée à partir d'un grand nombre de segments de gènes variables (V), de diversités (D) et de jonctions (J). Ce processus, appelé recombinaison V(D)J est aléatoire et unique à chaque LB et permet d'obtenir une très grande diversité dans le répertoire Ac. Le répertoire primaire d'Ac est, certes, capable de reconnaître un grand nombre d'antigènes (Ag) mais l'affinité avec laquelle il les reconnaît est souvent très faible. De plus, tous les isotypes sont des IgM, ce qui limite fortement le champ d'action des Ac. En modifiant la région variable des gènes des Ig, en introduisant des mutations appelées hypermutations somatiques (SHM), les LB activés des centres germinatifs (CG) vont ainsi considérablement augmenter la diversité et l'affinité de la réponse Ac (Pour revue (Marusawa et al., 2011)). De la même manière, en modifiant la région constante des Ig permettant le switch d'un IgM à un autre isotype par un mécanisme appelé commutation isotypique (CSR), le

LB va pouvoir adapter et orienter la réponse Ac en fonction du pathogène rencontré et du tissu où a lieu l'infection ou l'inflammation (Pour revue (Marusawa et al., 2011)).

La compréhension des modifications de l'ADN, au niveau des loci des Ig, à la base des mécanismes de SHM et CSR ont mis en évidence le rôle majeur d'une cytidine déaminase, l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) dans ces deux processus (Muramatsu et al., 2000). Le potentiel de AID à induire des mutations et des cassures de l'ADN en on fait un candidat sérieux dans les processus d'oncogénèse. Son incidence dans le développement de lymphomes B a été démontrée notamment par sa capacité à induire des mutations en dehors des gènes des Ig ou des translocations de gènes associés à des tumeurs tels que *c-myc*, *p53* ou *Pim* (Pasqualucci et al., 2008; Ramiro et al., 2004, 2006; Robbiani et al., 2008, 2009). Plus récemment, le rôle de AID dans le développement de tumeurs solides a été suggéré dans un contexte d'inflammation chronique. En effet une expression de AID a été retrouvée dans les tissus inflammatoires et dans les cellules tumorales de carcinomes touchant les organes digestifs. Ces cellules présentent de nombreuses mutations causées par AID au niveau des gènes *p53*, *CDKN2A* et *CDKN2B* (Endo et al., 2008; Matsumoto et al., 2010; Takai et al., 2011). La démonstration du rôle de AID dans le processus de cancérisation cellulaire en dehors des LB a été renforcé par l'utilisation de souris transgéniques exprimant AID de manière constitutive. Ces souris développent majoritairement des lymphomes T avec des mutations sur des proto-oncogènes tels que *c-myc* et des gènes suppresseurs de tumeur comme *p53* et dans une moindre mesure des cancers du poumon et des cancers gastriques. Ces données suggèrent qu'une surexpression de AID dans des cellules lymphoïdes non-B ainsi que dans des cellules non-lymphoïdes augmente le taux de mutation et participe au développement de cancer.

Enfin, une récente étude a mis en évidence l'expression de AID dans des lignées cellulaires T infectées par le deltarétrovirus appelé virus T-lymphotrope humain de type-1 (HTLV-1) (Ishikawa et al., 2011) qui, à l'instar du virus de l'immunodéficience humaine (HIV), infecte également les cellules T CD4⁺. HTLV-1 est l'agent étiologique d'une forme très agressive de leucémie/lymphome appelée Leucémie/Lymphome T de l'Adulte (ATL) caractérisée par une grande instabilité génétique et chromosomique. Les mécanismes moléculaires conduisant à la transformation des cellules T CD4⁺ suite à l'infection par HTLV-1 restent méconnus mais la découverte de l'expression de

AID dans ces cellules ainsi que dans les cellules cancéreuses associées (ATL) pourrait fournir une partie de la réponse.

L'ATL se développe après une longue période asymptomatique et reste à ce jour incurable. En effet les formes les plus agressives d'ATL ne répondent à aucune forme de traitement. Ces données suggèrent que des mécanismes de survie sont mis en place par HTLV-1 dans les cellules infectées. L'équipe du Dr Nathalie Bonnefoy travaille de puis plusieurs années sur la protéine anti-apoptotique Bfl-1 (Bcl-2 Fetal Liver) appartenant à la famille Bcl-2 dans les pathologies auto-immunes. Les membres de cette famille sont impliqués dans la régulation l'apoptose. Une dérégulation de l'expression de ces membres a été associée à un grand nombre de cancers (Heiser et al., 2004; Reed, 1998). Une surexpression de Bfl-1 a notamment été observée dans de nombreux lymphomes B et des tumeurs primaires (Feuerhake et al., 2005; Morales et al., 2005; Xia et al., 2006) et associée à une chimiorésistance aux drogues conventionnelles. Une surexpression de Bfl-1 a également été observée dans le lymphome de Burkitt induit par le virus d'Epstein-Barr (EBV). L'expression de Bfl-1 est induite par la protéine LMP-1 de EBV, via les voies NF- κ B et AP-1 (D'Souza et al., 2004; Pegman et al., 2006). Ces données suggèrent un rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées durant le processus de leucémogénèse. Dans le cas d'une infection par HTLV-1 une étude a suggéré que Tax pourrait induire l'expression de Bfl-1 via la voie NF- κ B (de la Fuente et al., 2003). Cependant les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 ainsi que son implication dans la survie ou la chimiorésistance dans les cellules infectées par HTLV-1 n'ont pas encore été démontrés.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté d'une part à développer des modèles permettant d'étudier le possible rôle de l'enzyme AID dans l'instabilité génétique et chromosomique induite par l'expression de la protéine virale Tax indispensable au processus leucémogène aboutissant à l'ATL. Dans un deuxième temps mon travail a visé à étudier les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 et son implication dans la survie et la chimiorésistance des cellules infectées par HTLV-1 permettant la persistance et l'accumulation des dommages à l'ADN.

Afin de mieux comprendre les enjeux de mes travaux nous rappellerons dans un premier temps le rôle de AID dans les LB des CG en insistant sur son mode d'action et sur la fine régulation dont AID fait l'objet au sein de ces cellules. Nous parlerons ensuite du rôle de AID dans le développement de pathologies cancéreuses dans des

organes lymphoïdes et non-lymphoïdes. Nous orienterons ensuite l'introduction sur le virus HTLV-1 en insistant sur l'oncoprotéine virale Tax et son implication dans l'apparition et la persistance des dommages à l'ADN. Enfin nous aborderons dans un dernier paragraphe la capacité de Tax à inhiber l'apoptose et son importance dans la persistance des dommages à l'ADN et la chimiorésistance.

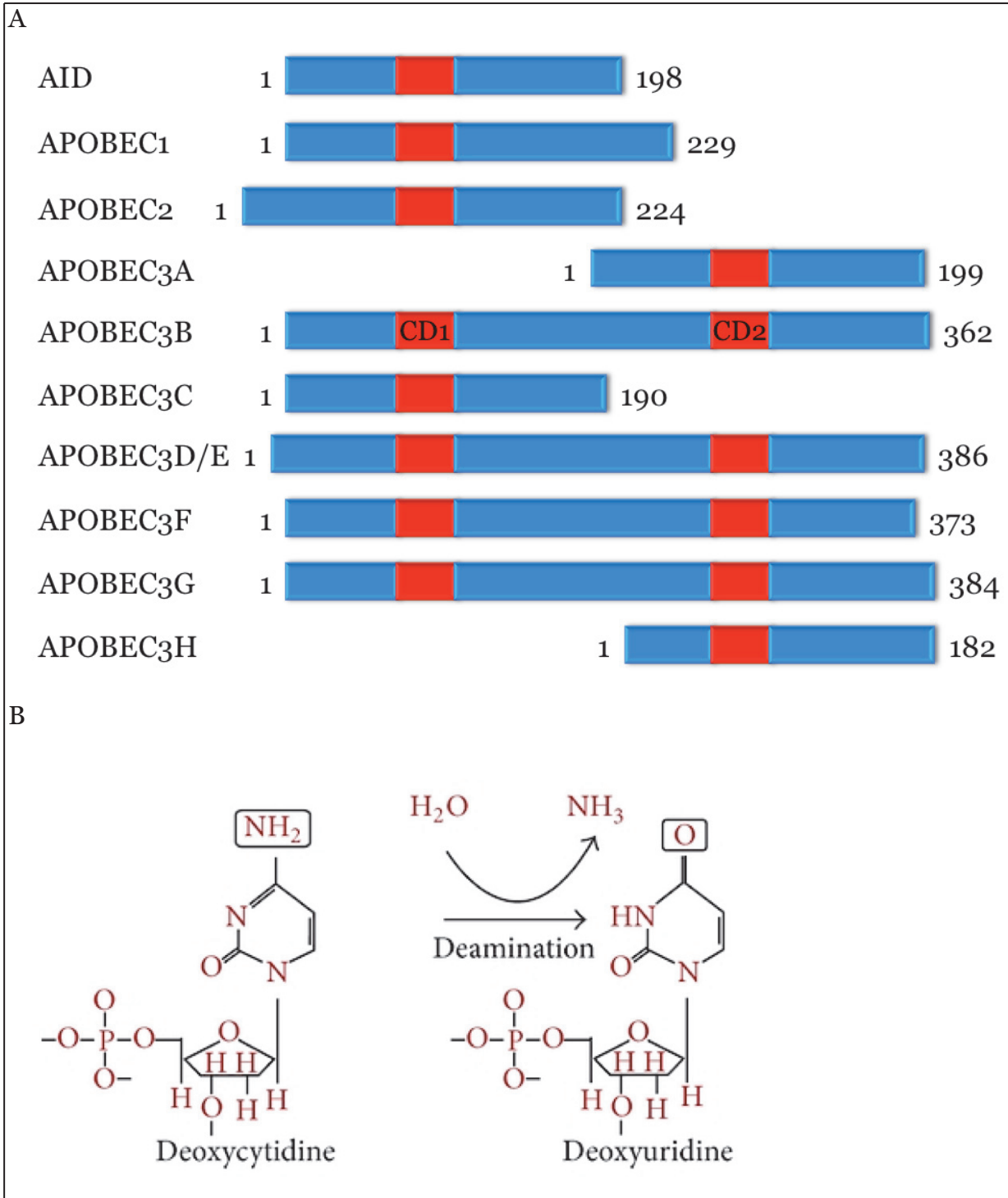


Figure 1 : Structure et fonction des membres de la famille AID/APOBEC humains. A) Représentation schématique de la structure des protéines APOBEC. Le(s) domaine(s) en doigt de zinc constituant le(s) domaine(s) catalytique(s) (CD) est représenté en rouge. Le nombre d'acides aminés constituant chaque protéine est indiqué sur la droite de chaque représentation. B) Schéma de la réaction enzymatique catalysée par les domaines CD résultant en une déamination des cytidine en uracile.

1. Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID)

AID est une protéine de 198 acides aminés d'un poids moléculaire de 24kDa codée par le gène *aicda* localisé sur le chromosome 12p13 et dont l'expression est physiologiquement restreinte aux cellules B. Le gène *aicda* a été cloné par hybridation soustractive entre cellules de LB CH12F3-2A stimulées et non-stimulées (Muramatsu et al., 1999; Nakamura et al., 1996). AID fait partie de la famille des Apolipoprotéine B mRNA-editing enzyme (APOBEC), dont le premier membre découvert fut APOBEC1, responsable de la désamination de l'ARNm de l'apolipoprotéine B, régulant ainsi le métabolisme des lipides. Les enzymes de la famille AID/APOBECs sont capables de désaminer les cytidines, les transformant en uracile aussi bien sur l'ADN que sur l'ARN (Figure 1). Cette famille regroupe AID, APOBEC1, APOBEC2 et APOBEC3 (A, B, C, D/E, F, G et H). Tous les APOBECs possèdent un domaine catalytique en doigts de zinc responsable de la désamination. Bien que très conservés, les membres de cette famille assument des fonctions différentes (Table 1). APOBEC1 désamine l'ARN de l'apolipoprotéine B, AID joue un rôle prépondérant la diversité du répertoire Ac et les APOBEC3 jouent un rôle dans l'immunité innée anti-virale. A l'heure actuelle, ni la cible, ni le rôle physiologique de APOBEC2 n'ont été découverts (pour revue (Conticello, 2008)).

A l'instar des autres membres de la famille APOBEC (A1 et A3), AID induit une désamination des deoxycytidines (dCs) en deoxyuraciles (dUs) créant une instabilité génétique essentielle à la maturation du répertoire des Ac au cours de la différenciation terminale des LB dans les CG des organes lymphoïdes secondaires. En effet, l'activité de AID est essentielle à deux processus cruciaux dans le développement et la diversité du répertoire des Ac : le processus de SHM et celui de CSR.

Le processus des SHM consiste en l'introduction de mutations ponctuelles au niveau des exons des régions variables (V) des chaînes lourdes (IgH) et légères (IgL) des Ig. Ces mutations vont conduire à une plus grande diversité et affinité des Ig (Martin and Scharff, 2002; Papavasiliou and Schatz, 2002).

La CSR, quant à elle, est un processus intrachromosomal de réarrangement des séquences par délétion-recombinaison au niveau des séquences constantes (C) et plus

Nom	Chromosome	Domaine catalytique	Localisation	Tissus	Cible	Motif (5'-3')	Action
AID	12p13	1	Cytoplasmique/ Nucléaire (actif)	LB GC	ADNsb	AGCT	Ig
APOBEC1	12p13.1	1	Cytoplasmique/ Nucléaire (actif)	Intestin	ARN, ADNsb	CAA (ApoB ARNm) CGA (NF1 ARNm)	ApoB
APOBEC2	6p21	1	Cytoplasmique/ Nucléaire	Cœur, muscle squelettique	Inconnue	Inconnu	Inconnue
APOBEC3A	22q13.1	1	Principalement nucléaire	Sang, kératinocytes, poumons, rate, intestin	ADNsb/db	CC	Anti- rétrovirale, anti-AAV
APOBEC3B	22q13.1	2	Cytoplasmique/ Nucléaire	Intestin, utérus, glande mammaire, kératinocytes, rate, cœur, thymus, ovaires, testicules, poumons	ADNsb	TCA	Anti- rétrovirale
APOBEC3C	22q13.1	1	Cytoplasmique/ Nucléaire	Rate, testicules, sang, cœur, thymus, prostate, ovaires	ADNsb	Inconnu	Anti- rétrovirale
APOBEC3D/E	22q13.1	2	Cytoplasmique	Thyroïde, rate, sang, poumons	ADNsb	(C/T)(T/A)(T/A)C(G/T)	Anti- rétrovirale
APOBEC3F	22q13.1	2	Cytoplasmique	Exprimé dans un large éventail de tissus, probablement coexprimé avec APOBEC3G	ADNsb	TTCT	Anti- rétrovirale
APOBEC3G	22q13.1	2	Cytoplasmique	Thymus, thyroïde, sang, rate, MO, poumons, cerveau, cœur, foie, reins, pancréas, testicules, ovaires, placenta	ADNsb	CCCA	Anti- rétrovirale
APOBEC3H	22q13.1	1	Cytoplasmique	Poumons, testicules, ovaires, foie fétal, peau, intestin, colon	ADNsb	TC	Anti- rétrovirale

Tableau 1 : Membres de la famille AID/APOBEC. Abréviations. LB GC : Lymphocytes B du centre germinatif ; Ig : Immunoglobulines ; ApoB : Apolipoprotéine B ; NF1 : Neurofibromine 1 ; MO : Moelle osseuse

particulièrement des régions S des IgH permettant de passer des isotypes IgM et IgD aux isotypes IgG, IgA et IgE (Honjo et al., 2002; Manis et al., 2002).

En dehors de son rôle physiologique dans les LB, il a été récemment démontré que AID était exprimée dans les cellules germinales primordiales et induisait la désamination de l'ADN afin d'activer des gènes impliqués dans la pluripotence ou de reprogrammer le profil épigénétique afin d'éviter la transmission d'épimutations. L'activation de gène pouvant conduire à la reprogrammation de la cellule en cellule pluripotente au pouvoir prolifératif illimité représente un risque majeur dans le développement de cancers. Une régulation drastique de l'expression et de la fonction de AID est donc nécessaire afin de préserver l'intégrité des cellules. Malgré une telle surveillance AID a une incidence dans plus de 80% des lymphomes B en induisant des mutations et des altérations génétiques en dehors des loci des Ig. Outre son rôle dans la lymphomagenèse des LB il a été démontré que dans un contexte inflammatoire souvent associé à une infection par un pathogène, AID était exprimée dans des cellules non-B et pouvait induire des mutations au niveau de proto-oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs suggérant un rôle majeur de AID dans le développement de cancers chez l'homme.

1.1. Mécanisme d'action de AID

1.1.1. Le modèle d'édition de l'ARN

Les gènes codant pour AID et APOBEC1, sont tous deux localisés sur le chromosome 12 à une distance inférieure à 1Mb, indiquant une duplication récente du gène (Conticello et al., 2005; Sawyer et al., 2004). De part sa très forte homologie au niveau du domaine catalytique avec APOBEC1 une enzyme éditrice de l'ARN (Muramatsu et al., 1999) et de sa localisation principalement cytoplasmique (Rada et al., 2002a; Schrader et al., 2005), AID a d'abord été proposée comme une enzyme désaminant un ou plusieurs ARN spécifiques servant d'intermédiaire à la fonction de désamination de l'ADN nécessaire aux processus de SHM et de CSR (Honjo et al., 2005; Muramatsu et al., 2000, 2007).

L'hypothèse proposée est que AID, associée à des co-facteurs, édite deux ARNm différents codant pour deux facteurs régulant respectivement le processus de SHM et

la CSR (pour revue (Honjo et al., 2005)). Ainsi, la région N-terminale de AID éditerait un microARN qui réprime l'expression de la Topoisomérase I, permettant ainsi le clivage des régions S nécessaire à la CSR (Kobayashi et al., 2009). Le domaine C-terminal quant à lui « capture » à l'aide de co-facteurs des ARNm puis les édite afin de générer de nouvelles protéines responsables des cassures doubles brins (DSBs) et de la CSR (Doi et al., 2003). A contrario, il semble que uniquement le domaine N-terminal de AID édite des ARNm ciblant les régions V des Igs dans le contexte du processus des SHM. Le choix de la cible, région V ou S semble dépendre des co-facteurs associés, déterminant ainsi les ARNm à éditer. Dans les deux cas, SHM ou CSR, le modèle d'édition de l'ARN implique que l'un des ARNm édités code pour une endonucléase capable d'aller cliver l'uracile généré.

Cependant, aujourd'hui le modèle d'édition de l'ARN reste une hypothèse, car en dépit de plusieurs données supportant cette théorie, aucune trace de ces ARN intermédiaires n'a pu être mise en évidence. De plus, une récente étude démontre que AID est incapable de désaminer les cytidines dans des ARN chimériques à cause de la conformation des riboses différente de celle des désoxyriboses, qui semblent quant à eux parfaitement adaptés au site catalytique de AID (Nabel et al., 2013)..

1.1.2. Le modèle de la désamination de l'ADN simple brin

Contrairement au modèle d'édition de l'ARN, ce second modèle suggère que AID muterait directement l'ADN. L'activité désaminase de AID sur l'ADN a été mise en évidence pour la première fois dans la bactérie *E. coli* (Petersen-Mahrt et al., 2002; Ramiro et al., 2003; Sohail et al., 2003). A la suite de quoi, plusieurs études ont montré que la protéine AID purifiée à partir de cellules B activées était capable de désaminer de l'ADN simple brin (sb) (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Morgan et al., 2004; Pham et al., 2003; Shen et al., 2005). Cependant, ces premières données ne démontrent que la capacité *in vitro* de AID à désaminer l'ADN et non sa capacité à désaminer l'ADN *in vivo*. De plus APOBEC1 qui est enzyme éditrice de l'ARN est également capable de désaminer l'ADN sb *in vitro* dans *E. coli* (Harris et al., 2002; Petersen-Mahrt and Neuberger, 2003).

Un premier argument en faveur du modèle de désamination de l'ADN est la démonstration de la nécessité de la présence de l'uracile DNA glycosylase (UNG) pour l'activité de AID au cours du processus de CSR. En effet, des études menées sur des souris UNG-déficientes ont montré que la CSR était significativement réduite, à environ 10% de la CSR observée dans les cellules B des souris WT (Rada et al., 2002b) alors que le processus de SHM n'est pas affecté (Begum et al., 2004). En l'absence de l'enzyme UNG, l'ADN ne peut pas être clivé après action de AID expliquant la diminution significative de CSR dans les cellules B de souris UNG-déficientes. En revanche, les mutations impliquées dans la SHM peuvent être introduites par réplication de l'ADN conduisant à des transitions U:G $\rightarrow$ A:T.

Un second argument est la capacité de AID à se fixer sur l'ADN sb au cours de la transcription. Ainsi, il a été démontré que suite à son interaction avec la protéine de réplication A (RPA) et la protéine 14-3-3, AID se lie directement sur les régions S au niveau des motifs 5'-AGCT-3' après activation des cellules B en présence d'IL-4 et de CD40-L ou encore en présence de LPS (Chaudhuri et al., 2004; Xu et al., 2010).

Enfin, il a été démontré par des études biochimiques *in vitro* que AID était capable de désaminer de l'ADN sb, mais pas de l'ADN db, de l'ARN ou une structure hybride ADN/ARN (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003).

Plus récemment, le séquençage de l'ARN de LB activés n'a montré aucune trace de désamination liée à AID (Fritz et al., 2013) alors qu'une accumulation de dUs a été observée au sein des locus des Ig (Maul et al., 2011).

Ces expériences démontrant une forte affinité pour l'ADNsb ainsi que la présence de dUs au niveau de l'ADN génomique constituent la preuve la plus forte en faveur du modèle de désamination de l'ADN qui est à ce jour le modèle accepté par la majorité de la communauté scientifique.

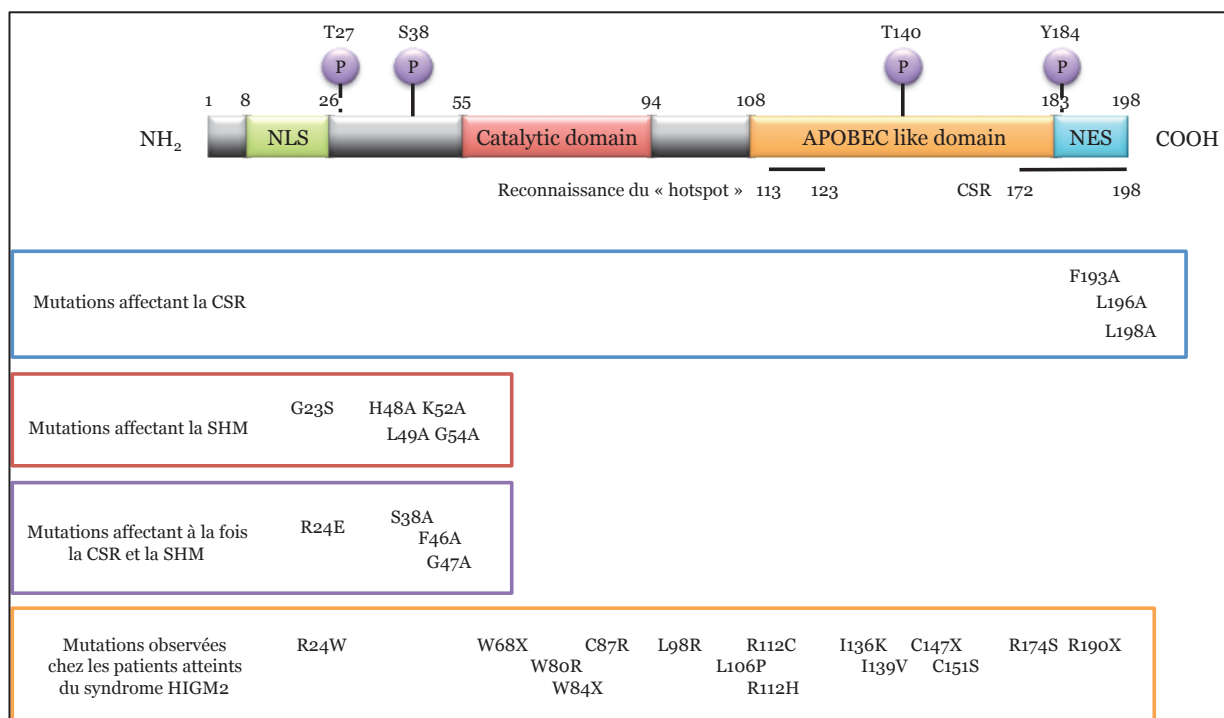


Figure 2 : Schéma de la structure primaire de AID et mutations affectant les processus de SHM et CSR. Les domaines de localisation (NLS) et d'export nucléaire (NES), le domaine catalytique ainsi que le domaine « APOBEC-like » sont représentés. Le domaine N-termianal est essentiel pour la SHM alors que le domaine C-terminal est essentiel pour la CSR. Le domaine catalytique contient le résidue E58 qui sert de catalyseur acide-base, ainsi que les résidues H56, C87 et C90 capable de fixer le Zn^{2+} . Le domaine APOBEC-like est capable de fixer l'ADN autour des dCs et ainsi d'influencer la spécificité de la séquence désaminée. Les mutations générées expérimentalement affectant la SHM et/ou la CSR sont indiquées de la manière suivante : acide aminé d'origine-position-acide aminé de substitution. Selon le même format les mutations fréquemment rencontrées chez les patients atteints du syndrome d'HIGM2 sont indiquées dans l'encadré orange.

1.2. Mise en évidence du rôle de AID dans les processus de SHM et de CSR

En 2000 des travaux ont démontré qu'une seule enzyme, AID, était responsable à la fois du processus de SHM et de la CSR (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Le rôle de AID dans ces deux mécanismes a été mis en évidence à la fois par l'étude de souris déficientes pour AID et par l'étude des patients présentant un syndrome d'hyper IgM de type II (HIGM II) pour lesquels des mutations affectant l'activité de AID ont été identifiées.

L'analyse de la séquence protéique de AID chez les patients HIGM II a révélé la présence de mutations tout le long de la séquence de AID (Durandy et al., 2006; Revy et al., 2000) (Figure 2). De façon intéressante, il a été mis en évidence que les mutations induisant une perte de fonction de AID ne sont pas uniquement localisées au niveau du domaine catalytique mais aussi au niveau des séquences NLS (Nuclear Localization Site), linker, apobec-like et NES (Nuclear Export Site). En fonction de la localisation des mutations, il en résulte soit la perte des deux mécanismes CSR et SHM, soit uniquement la perte de CSR conduisant à une immunodéficience sévère (Figure 2). Le phénotype des souris AID déficientes est sensiblement le même que chez les patients HIGM II, renforçant ainsi l'idée que AID est nécessaire à la fois à la CSR et au processus de SHM (Muramatsu et al., 2000). Comme chez les patients HIGM II, les mutations au niveau de la région N-terminale de AID affectent à la fois les mécanismes de SHM et de CSR. Il apparaît notamment, chez les souris pour lesquelles AID est mutée au niveau de la partie N-terminale, un défaut de clivage de l'ADN au niveau des régions V et S, impliquant la partie N-terminale de AID dans le clivage de l'ADN dans ces régions (Doi et al., 2009; Shinkura et al., 2004). Il est à noter, chez ces souris, que le processus de SHM est beaucoup plus affecté que celui de la CSR (Shinkura et al., 2004). Cette différence peut s'expliquer de deux façons. La première étant que la partie N-terminale se lierait préférentiellement avec des co-facteurs favorisant le processus de SHM plutôt que la CSR. La seconde étant que les régions S, de part leur forte concentration en région 5'-AGCT-3', identifiée comme séquence cible de AID, sont clivées environ 5 fois plus efficacement par AID que les régions V (Doi et al., 2009). En revanche, les mutations au niveau de la région C-terminale de AID n'affectent que le processus de CSR. En effet, dans ces mutants l'activité de clivage de l'ADN reste intacte aussi bien au niveau des régions V que des régions S (Doi et al., 2009; Sabouri et al., 2014) suggérant que la CSR nécessite une

étape de recombinaison assurée par le domaine C-terminal en plus du clivage de l'ADN (Doi et al., 2009).

En résumé, il apparaît évident que AID contrôle deux fonctions différentes au niveau des régions V et S des Ig en sus de son activité cytidine désaminase : une fonction de clivage des régions V et S, impliquant son domaine N-terminal et une fonction de recombinaison des régions S impliquant sa région C-terminale. On peut alors penser que ces deux fonctions sont dues au recrutement des co-facteurs différents responsables, soit dans le clivage de l'ADN, soit dans la formation de synapse S-S et dans la recombinaison.

1.2.1. Le processus d'hypermutation somatique

Au cours du processus de SHM, des mutations ponctuelles, voire parfois des insertions ou des délétions, sont introduites dans les régions V des IgH et Igκ/λ à une fréquence élevée (10^{-2} à 10^{-3} par paire de bases par génération). Les quatre bases peuvent être la cible de mutations chez l'homme et la souris. Les paires C:G et A:T sont ciblées à une fréquence relativement identique, ce qui paraît plutôt surprenant sachant aujourd'hui que c'est l'enzyme AID qui est responsable de ce processus. Nous reviendrons sur cette particularité en fin de paragraphe.

L'observation la plus frappante de ce processus a été faite pour la première fois par Weigert et al (1970) qui ont découvert que 7 des 19 chaînes Vλ étaient hautement conservées, à l'exception de quelques substitutions d'acides nucléiques, alors que les 12 autres chaînes restaient 100% identiques (Weigert et al., 1970).

La preuve directe que le phénomène de SHM résulte de modifications génétiques a été apportée par les travaux de Tonegawa, Weigert et d'autres chercheurs qui ont comparé les séquences de cellules de lignées germinales et celles de gènes Vλ réarrangés des Igs (Pour revue (Rajewsky, 1996)).

Le processus de SHM a lieu lors de la transcription des gènes des Igs, principalement sur le brin non-transcrit qui est alors accessible sous forme d'ADNsb au sein d'une bulle de transcription. Les SHM ne se produisent pas de manière aléatoire au niveau des segments V mais préférentiellement au niveau d'un motif de type WRCY (ou W = A/T ; R = A/G ; Y = C/T ; (Golding et al., 1987; Rogozin and

Diaz, 2004; Smith et al., 1996). En 2003, Bransteitter et al. démontrent qu'au sein de ce motif, AID désamine les dCs en dUs préférentiellement au niveau de séquences conservées 5'-AGCT-3' (Bransteitter et al., 2003). La majorité des altérations génétiques des régions V se situe soit 100-200pb en amont soit 1,5-2kb en aval du site d'initiation de la transcription des segments V_H , épargnant ainsi les éléments régulateurs du promoteur, les enhancers introniques et les segments C, certainement parce que AID ne peut accéder à ces régions (Lebecque and Gearhart, 1990; Longerich et al., 2005; Rada et al., 1997)(Both et al., 1990).

La désamination des dCs par AID résulte en un mésappariement U:G (Petersen-Mahrt et al., 2002) qui conduit à l'apparition de différentes mutations en fonction de la manière dont ce mésappariement est pris en charge par la cellule (Neuberger et al., 2005) (Figure 3).

Il est admis aujourd'hui que le processus de SHM peut être divisé en deux phases : la première ciblant les paires de bases G:C et la deuxième intervenant au niveau des paires de bases A:T. Dans le premier cas, suite à la désamination du dC, si le mésappariement U:G n'est pas réparé avant la répllication de l'ADN, l'ADN polymérase va insérer un dA par complémentarité avec le dU, générant ainsi une transition $dC \rightarrow dT$ et $dG \rightarrow dA$ (Petersen-Mahrt et al., 2002). Si la lésion dU est prise en charge par l'UNG, une enzyme du BER (Base Excision Repair) qui va cliver le dU généré, un site abasique sera créé, le désoxyribose sera alors clivé par l'apurique/apyrimidique endonucléase (APE) de la voie du BER. Le site abasique sera ensuite comblé de manière aléatoire par des polymérases translesionnelles, telles que Rev1, Pol β , Pol η donnant, soit une réparation fidèle ($dC:dG$), soit une transition ($dC \rightarrow dT$; $dG \rightarrow dA$), soit une transversion (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique et inversement). Dans le deuxième cas, bien que la désamination d'un dC par AID soit à l'origine de la mutation, ce sont les paires de bases A:T qui sont touchées. Cette alternative a été mise en évidence dans des souris déficientes pour la protéine MSH2 qui présentent une très forte diminution du taux de mutations au niveau des paires de bases A:T alors que les mutations touchant les paires de bases G:C ne sont pas affectées. Cette phase est assurée par une autre voie de réparation du mésappariement dU:dG qui fait intervenir l'hétérodimère MSH2-MSH6 de la voie du MMR (MisMatch Repair). MSH2-MSH6 est capable de se lier au

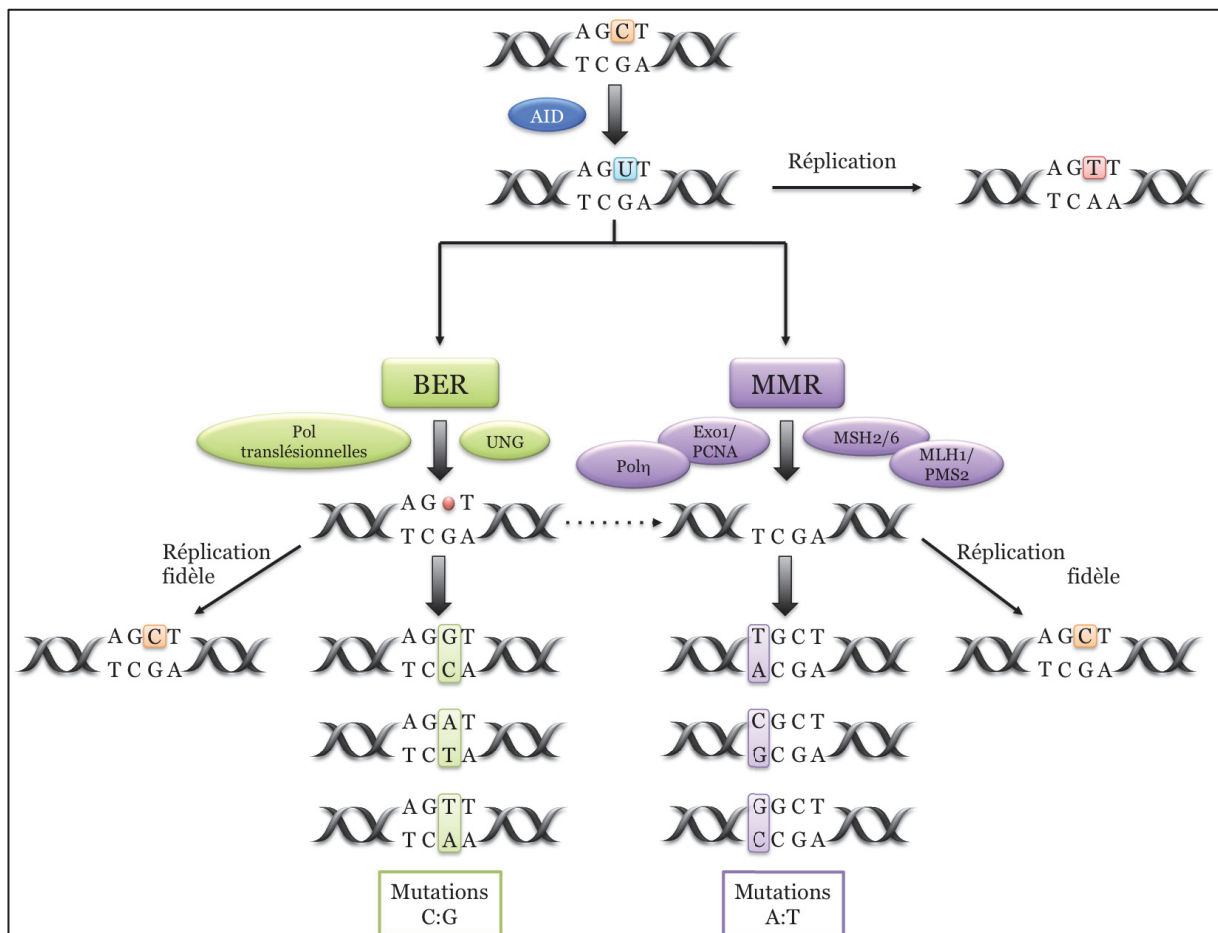


Figure 3 : Voies de réparations impliquées dans la SHM. La lésion dU générée par AID qui conduit à un mésappariement dU:dG sera soit répliqué donnant une transition T:A, soit prise en charge par la voie du BER menant à des mutations au niveau des bases C:G soit prise en charge par le complexe MSH2/6 conduisant à des mutations au niveau des paires de bases A:T. la flèche en pointillés représente la voie alternative permettant suite à l'action de l'UNG d'obtenir des mutations au niveau des paires de bases A:T.

dU ou dG, sans préférence de base ou de brin, mais pas au niveau d'un site abasique ou du groupe désoxyribose généré par UNG.

De manière très schématique MSH2-MSH6 va recruter l'exonucléase 1 (Exo1) qui va exciser un fragment d'ADN contenant le dU. Dans un second temps, le complexe MSH2-MSH6 va recruter et se lier à la Pol η et stimuler son activité catalytique. La Pol η qui a une très faible fidélité, va synthétiser le fragment d'ADN manquant en introduisant des mutations au niveau de paires de bases dA:dT, en aval de la lésion dU (Peled et al., 2008; Petersen-Mahrt et al., 2002; Wilson et al., 2005), (Delbos et al., 2007; Zeng et al., 2001).

Il a été décrit que dans certains cas, une voie alternative, dépendante de l'action de l'UNG et faisant aussi intervenir des polymérases de faible fidélité conduisait à des mutations au niveau des paires de bases A:T (Pour revue (Di Noia and Neuberger, 2007)). Bien que les mécanismes clairs permettant de générer ces mutations au niveau des paires de bases dA:dT restent inconnus, et qu'ils semblent indépendants de l'action directe de AID, il est à noter que les mutations au niveau des paires de bases dA:dT représentent plus de la moitié des mutations accumulées au niveau des régions V lors du processus de SHM (Longerich et al., 2006; Tippin and Goodman, 2001)

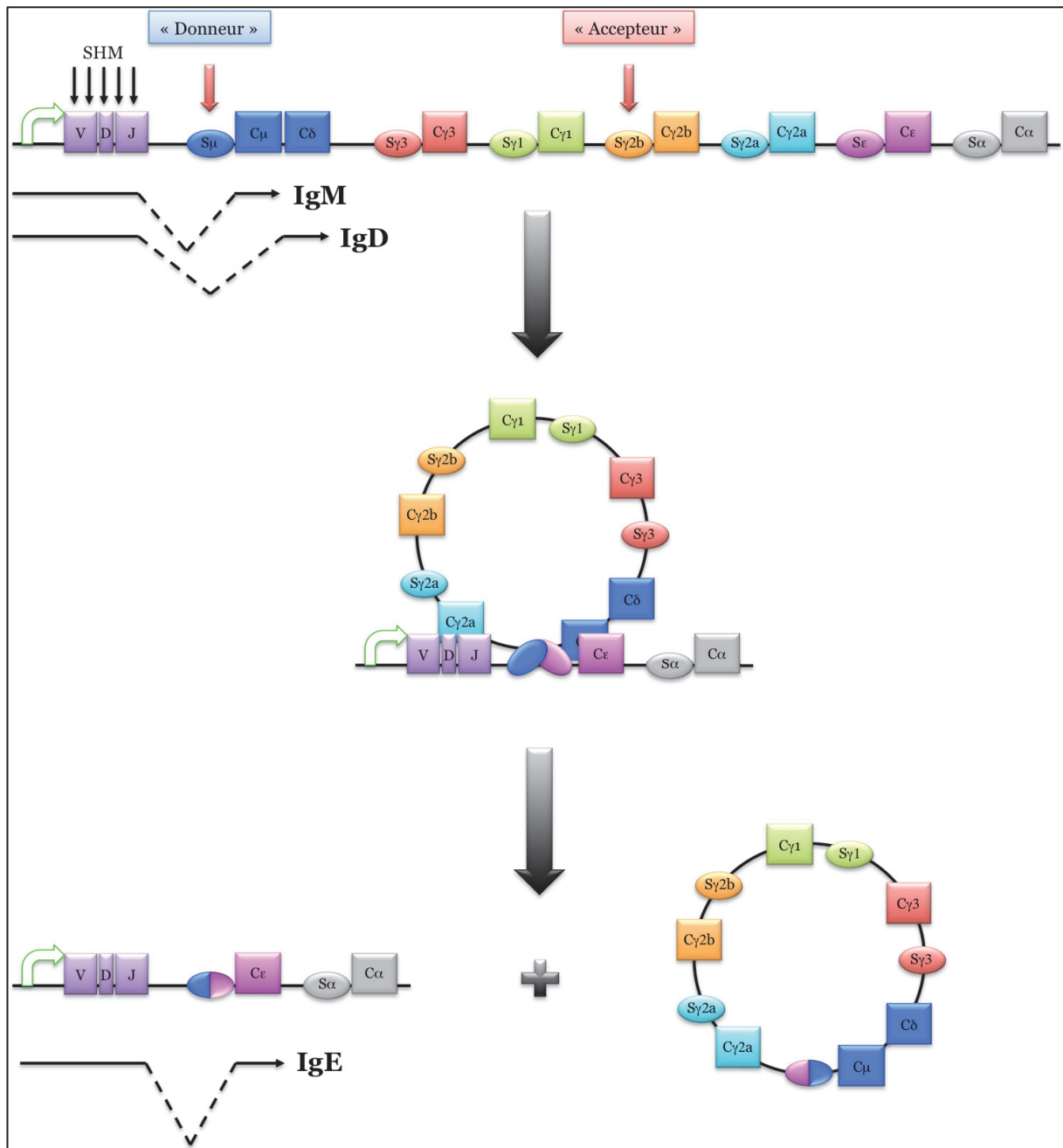


Figure 4 : Schéma du processus de CSR vers l'isotype IgE. Le locus IgH humain code naturellement pour les IgM et IgD. Au cours de la CSR les lésions d'US induites par AID au niveau des régions S « donneur » (S_μ) et « accepteur » (ici S_ϵ) vont être converties en DSBs. L'ADN se trouvant entre les régions S « accepteur » et « donneur » est éliminé sous la forme d'épisode circulaire. Les extrémités S créées seront jointes et formeront une synapse S puis seront liées afin de former un nouveau locus permettant l'expression d'un nouvel isotype (ici IgE).

1.2.2. La commutation isotypique

Le processus de CSR a été mis en évidence la première fois par Uhr, Nossal et Cooper qui ont démontré que les LB qui exprimaient des IgM changeaient leur isotype d'Ig suite à une stimulation antigénique (pour revue (Honjo et al., 2002)). Ce changement d'isotype repose sur un mécanisme de réarrangement intrachromosomal permettant de modifier la région C des chaînes lourdes des Igs, et ainsi de modifier l'isotype de l'Ig, sans modifier sa spécificité, chaque isotype (M, D, A, G ou E) ayant une fonction propre durant la réponse immunitaire. En 1978, Kataoka et Honjo proposent que ce processus soit le résultat d'une délétion mono-allélique en épingle à cheveux permettant le rapprochement des séquences V et C sélectionnées (Honjo and Kataoka, 1978).

Le processus de CSR cible le locus C_H et plus particulièrement les régions switch (S) situées en 5' de chaque gène C_H , excepté pour le locus $C\delta$. Chez les mammifères, les régions S allant de 1 à 12kb sont caractérisées par des répétitions de séquences en tandem, souvent riches en G sur le brin d'ADN non transcrit avec des répétitions de motifs de type TGGGG, GGGGT, GGGCT et GAGCT (contenant la séquence palindromique AGCT, cible préférentielle de AID), (Dunnick et al., 1993; Zarrin et al., 2004), (Min et al., 2005). Le processus de CSR se produit entre la région $S\mu$ dite "donneuse" et une des régions $S\gamma$, α ou ϵ dite "acceptrice" (Figure 4). L'exon $C\mu$ est excisé puis remplacé, en fonction du contexte cytokinique et antigénique, par l'exon $C\gamma$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$ (Chaudhuri and Alt, 2004; Manis et al., 2002).

Le rôle des régions S dans la CSR a été mis en évidence par délétion du locus $S\mu$, ce qui abroge totalement la CSR vers d'autres isotypes alors que la délétion de $S\gamma_1$ inhibe seulement la CSR vers IgG1 (Luby et al., 2001; Shinkura et al., 2003), (Khamlichi et al., 2004).

Une étude récente suggère l'idée audacieuse qu'en l'absence de $S\mu$, $S\gamma_1$ peut servir de donneur et induire une CSR séquentielle (Zhang et al., 2010). L'ADN se trouvant entre les deux régions S recombinaison est excisé et circularisé comme pour la recombinaison V(D)J (Honjo et al., 2002; Iwasato et al., 1990; Kinoshita et al., 2001; Matsuoka et al., 1990; Schwedler et al., 1990). La CSR se fait ensuite par jonction des deux fragments de séquences S générés plutôt que par recombinaison homologue (Manis et al., 2002; Stavnezer, 1996).

Comme pour les processus de SHM, la CSR a lieu lors de la transcription des chaînes lourdes des Igs. Au niveau des régions S, la transcription génère une structure hybride ADN:ARN formant une boucle R laissant apparaître des fragments d'ADNs_b accessibles à AID (Chaudhuri and Alt, 2004; Chaudhuri et al., 2007; Yu and Lieber, 2003). Les séquences 5'-AGCT-3' représentent plus de 45% des séquences S_μ alors qu'elles ne représentent qu'à peine 1,4% du génome entier (Xu et al., 2010), expliquant en partie pourquoi l'activité de AID est « restreinte » aux loci des Igs dans les cellules B.

Récemment, il a été mis en évidence que le facteur d'épissage PTBP2 (polypyrimidine tract binding protein-2) est capable de se lier à AID et de promouvoir son recrutement sur les régions S (Nowak et al., 2011). L'utilisation de short-hairpin RNA dirigés contre PTBP2 conduit à un défaut de recrutement de AID sur les régions S et à la perte du processus de CSR dans les cellules CH12 (Nowak et al., 2011).

Contrairement au processus de SHM, la CSR nécessite des cassures d'ADN double brin afin de compléter le switch à la suite de la désamination. Les dUs ont donc besoin d'être convertis en cassures sur les deux brins opposés. Ces cassures sont assurées par les voies du BER et du MMR (Mismatch Repair). Comme décrit lors du processus de SHM, l'enzyme UNG de la voie du BER va exciser les dUs générés par AID en créant un site abasique. L'UNG est cruciale pour la CSR. Chez les souris déficientes pour UNG la CSR est réduite de près de 90% comparé aux souris WT (Rada et al., 2002b).

Par la suite, APE va cliver les désoxyriboses libres et générer des cassures simple brin (SSB) (Petersen-Mahrt et al., 2002). Le trou ainsi créé sera comblé par l'action de l'ADN Pol β (Christmann et al., 2003; Guikema et al., 2007; Petersen-Mahrt et al., 2002; Rada et al., 2002b; Schrader et al., 2005). Cette voie de réparation ne génèrera que des SSB.

Si les SSB générées par la voie du BER (UNG-APE) sont proches les unes des autres sur les brins opposés, elles pourront former spontanément des DSB. Si les SSB sont trop éloignées elles seront simplement réparées.

D'un autre côté les lésions dU peuvent être prises en charge par la voie du MMR qui causera, elle, des DSB (Schrader et al., 2007; Stavnezer and Schrader, 2006).

La voie MMR peut également convertir des SSB en DSB. Brièvement, le complexe MSH2-MSH6 va se lier à l'ADN au niveau des dUs et recruter le complexe MLH1-PMS2 (Kunkel and Erie, 2005; Wilson et al., 2005) ainsi que Exo1 qui va exciser l'ADN contenant le dU et transformer les sites abasiques et les SSB en DSB (Genschel et al., 2002). Les DSB vont être prises en charge par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) (Boboila et al., 2012). Nbs1 va activer la kinase ATM qui, à son tour, va phosphoryler l'histone H2AX et ainsi stabiliser les DSB et servir de point d'encrage pour un grand nombre de protéines impliquées dans la réponse de dommages à l'ADN (Bassing and Alt, 2003; Paull et al., 2000).

Bien que les régions S soient toutes riches en G avec des motifs répétés en commun, le degré d'homologie entre ces régions n'est pas suffisant pour que la réparation des DSB se fasse par recombinaison homologue. Le mécanisme le plus commun pour joindre les extrémités générées par les DSB est la voie classique de jonction des extrémités par recombinaison non homologue (C-NHEJ ; Figure 5). Les principales protéines impliquées dans la NHEJ sont KU 70/80, le complexe XRCC4-ligase IV, DNA-PKcs et XLF/cernunnos (Pour revue (Boboila et al., 2012)). En effet, les LB matures déficients pour Ku70/Ku80 montrent un défaut sévère dans la CSR (Casellas et al., 1998; Manis et al., 1998). De même, l'absence d'expression de XRCC4 ou de la Ligase IV dans les LB activés conduit à une forte diminution du taux de CSR accompagnée d'une accumulation de cassures induites par AID au niveau des locus des IgH (Yan et al., 2007). Enfin, des mutations au niveau de la DNA-PKcs et de XLF conduisent à l'augmentation du nombre de cassures au niveau des locus des IgH ainsi que des translocations chromosomales, même dans les cas où la fréquence de CSR n'est pas altérée (Pour revue (Boboila et al., 2012)).

Dans les LB matures déficients pour les deux plus importants facteurs de la C-NHEJ, XRCC4 et LigIV, la CSR n'est pas totalement abolie, suggérant une voie alternative de jonction des extrémités formées (A-EJ) (Soulas-Sprauel et al., 2007; Yan et al., 2007). Bien qu'aucun facteur propre à l'A-EJ n'ait été identifié, plusieurs protéines impliquées dans les voies de réparation à l'ADN jouent un rôle dans l'A-EJ comme Parp1, Mre11 et CtIP (Audebert et al., 2004; Helmink et al., 2011; Nussenzweig and Nussenzweig, 2007; Wang et al., 2006; Yun and Hiom, 2009) (Figure 5). Ces protéines sont capables de reconnaître les DSB par l'intermédiaire de Parp1 puis d'exercer une activité endo- et exonucléasique, laissant apparaître des domaines de

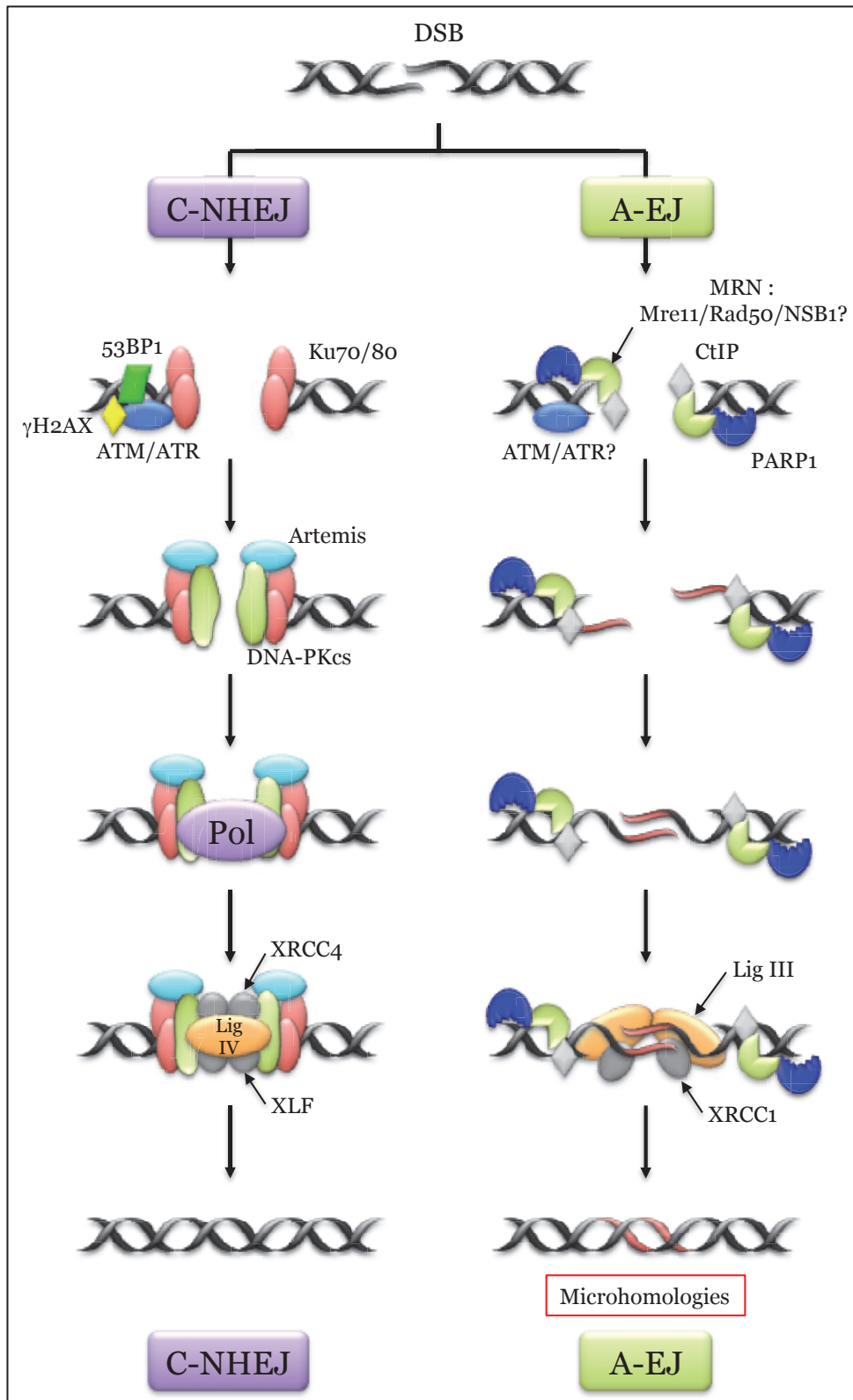


Figure 5 : Voies de réparation impliquées dans la CSR. Les DSB générées au cours de la CSR peuvent être réparées de deux manières distinctes, la C-NHEJ ou l'A-EJ. Dans le modèle prédominant de réparation C-NHEJ, Ku70/80 se lie aux extrémités et recrute et active DNA-PKc qui à son tour va activer Artémis. Cette étape est sûrement importante dans la formation de la synapse indispensable à la C-NHEJ. Après action de la polymérase, la ligation est assurée par le complexe Lig IV/XRCC4. La réparation A-EJ reste à ce jour mal connue. Les facteurs Mre11, CtIP et PARP1 semblent impliqués dans la reconnaissance des DSB. Mre11 et CtIP pourraient promouvoir la jonction par microhomologies impliquée dans l'A-EJ. XRCC1 et la Lig I seraient responsables de la ligation des extrémités.

micro-homologies au niveau des régions S. Elles peuvent également générer de courts fragments de nucléotides complémentaires au niveau des DSB. Le complexe XRCC1/Ligase III va ensuite assurer la jonction des fragments d'ADN.

A ce jour, on ne sait toujours pas si l'A-EJ a un rôle physiologique dans la CSR autre qu'être activée en absence de la C-NHEJ. Cependant, récemment le groupe de Verdun apporte une part de réponse à cette question en démontrant que les voies C-NHEJ et A-EJ sont utilisées en parallèle, au cours de la CSR et que le choix du mode de jonction se ferait en fonction de la nature de la lésion (Cortizas et al., 2013). Si la concentration en dUs est importante alors c'est la voie C-NHEJ qui serait favorisée, si au contraire le taux de dUs est faible au niveau des régions S alors la voie CtIP/MSH2 de l'A-EJ serait en charge des jonctions.

1.3. Un rôle en dehors de cellules du système immunitaire : la déméthylation de l'ADN

Des cellules souches pluripotentes induites (CSPi), qui sont caractérisées par une prolifération illimitée et une pluripotence similaire aux cellules souches embryonnaires (CSE), ont été générées pour la première fois par le simple ajout de facteurs bien définis, Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 à partir de fibroblastes de souris embryonnaires et adultes (Takahashi and Yamanaka, 2006). Par la suite, d'autres études ont démontré que la combinaison de ces 4 facteurs était suffisante à la reprogrammation des cellules humaines et de souris en CSPi (Aoi et al., 2008; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Wernig et al., 2007; Yu et al., 2007).

Au cours de la transformation des fibroblastes en CSPi, les promoteurs des gènes *Nanog* et *Oct3/4* sont fortement déméthylés (Takahashi and Yamanaka, 2006) alors que ces régions présentent une très forte méthylation dans les CSPi suggérant un rôle crucial de la déméthylation de ces gènes dans la reprogrammation de cellules en CSPi (Mikkelsen et al., 2008). Il a également été démontré que le profil de méthylation de l'ADN était entièrement reprogrammé dans les stades précoces de l'embryon ainsi que dans les cellules germinales primordiales (CGP) (Li, 2002; Reik et al., 2001; Surani, 2001).

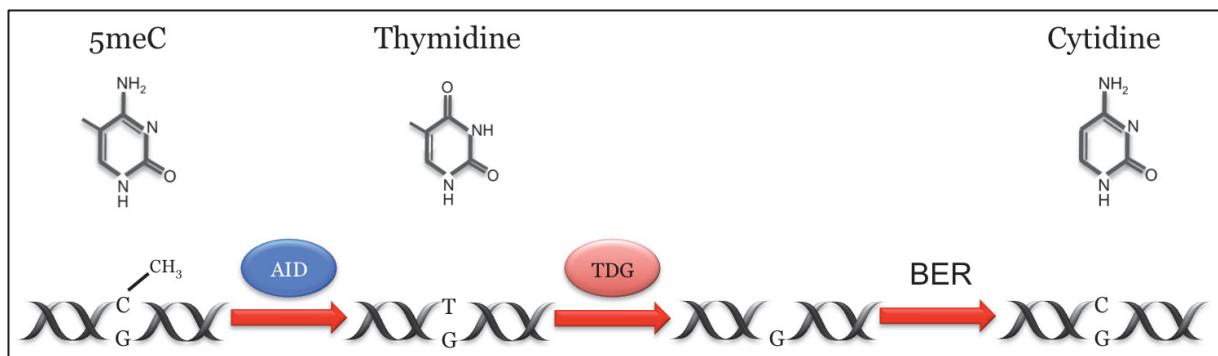


Figure 6 : Mécanisme de déméthylation de l'ADN impliquant AID. AID peut désaminer une cytidine méthylée (5meC) générant ainsi une thymidine. La thymidine sera excisée sous l'action de la thymine DNA glycosylase (TDG). Le site abasique sera pris en charge par la voie du BER qui introduira une cytidine en lieu et place de la 5meC.

La méthylation chez les mammifères touche en grande partie les dCs au sein d'îlots CpG. Les 5-Méthylcytosines (5meC) subissent des désaminations spontanées (5meC→T) pouvant être à l'origine de mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs ou de proto-oncogènes (pour revue : (Jones and Baylin, 2002). Basé sur ces observations, un rôle de AID dans la désamination des 5meC et le contrôle de la déméthylation de l'ADN a été suggéré.

En 2004 Morgan et al., démontrent que les transcrits de AID sont exprimés en faibles quantités dans les CSE, les ovocytes et les CGP. De plus, ils ont montré que dans *E. Coli* et *in vitro*, AID est capable de désaminer les 5meC en T (Morgan et al., 2004).

En 2008, dans des embryons de poissons zèbres, il a été démontré que AID jouait un rôle dans la déméthylation de l'ADN par un mécanisme couplé de déamination des 5meC suivi de l'excision des T générés par la methylI-domain binding protein 4 (Mbd4) (Rai et al., 2008). Ces données suggèrent que la déméthylation de l'ADN peut se faire par le biais d'une désamination induite par AID suivi d'une excision de la base (Figure 6). Ces travaux sont la première évidence d'un rôle de l'enzyme AID en dehors du système immunitaire.

En 2010, Buthani et al., ont étudié le rôle de AID dans la déméthylation de l'ADN liée à la reprogrammation de cellules somatiques en CSE pluripotentes. La manipulation de ces CSE est à la base du développement de nouvelles techniques de médecine régénératives, et l'étude de mécanismes permettant de reprogrammer des cellules somatiques est d'un enjeu crucial. Ainsi, les auteurs ont créé un hétérocaryon inter-espèces en fusionnant des CES de souris avec des fibroblastes humains. Ce modèle, bien plus efficace que ceux développés jusqu'à présent, comme les CSPi, permet une reprogrammation rapide (1 jour) avec une efficacité d'environ 70% (Bhuthani et al., 2010). Ils ont observé que AID se fixait sur les promoteurs méthylés inactifs des gènes *Oct4* et *nanog* dans les hétérocaryons mais non sur les promoteurs actifs des CSE. De plus, l'utilisation de siRNA dirigés contre AID dans ces CSE inhibe la déméthylation de ces promoteurs suggérant 1/ que AID est impliquée dans la déméthylation des promoteurs de ces gènes inducteurs de pluripotence dans les cellules somatiques et 2/ que AID est indispensable à la reprogrammation de ces hétérocaryons (Bhuthani et al., 2010). En accord avec ces données, l'étude du profil de

méthylation de l'ADN par la technique d'unbiased bisulfite Next Generation Sequencing de cellules germinales primordiales a révélé que l'absence de AID inhibait la déméthylation de l'ADN permettant la reprogrammation des cellules (Popp et al., 2010).

Plus récemment, Karpurapu et al., ont également démontré que AID était indispensable à la déméthylation du promoteur de *Klf4* lors de la différenciation des monocytes en macrophages (Karpurapu et al., 2014).

Ces résultats démontrent que AID a une fonction essentielle dans la reprogrammation épigénétique lors de l'embryogenèse et potentiellement dans la restriction de la transmission d'épimutations et de transposons chez les mammifères. Il est à noter que dans les cellules non-B exprimant AID, ce rôle de régulateur épigénétique peut aussi avoir un effet indésirable puisque la méthylation ou la déméthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs ou de proto-oncogènes pourrait favoriser la cancérisation des cellules. De plus, la reprogrammation épigénétique de cellules exprimant AID favorisant l'expression de gènes de pluripotence comme *nanog*, *Oct3/4* ou *Klf4* notamment indispensable à la génération de CSPi, pourrait transformer ces cellules en cellules pluripotentes au pouvoir prolifératif illimité favorisant ici encore la tumorigenèse. Nous reviendrons sur le rôle oncogène de AID dans le paragraphe 1.8.

1.4. Régulation de l'expression de AID

Compte tenu de sa capacité à induire des modifications majeures au niveau de l'ADN, il est indispensable que l'expression et l'activité de AID soient très finement régulées afin de pouvoir développer une réponse immunitaire robuste mais aussi de garantir l'intégrité du génome cellulaire.

Comme un grand nombre de protéines, l'expression de AID va être modulée à différents niveaux que nous détaillerons ici, tout d'abord au niveau transcriptionnel, puis au niveau post-transcriptionnel et enfin au niveau post-translationnel. Compte tenu de son rôle physiologique au cours des processus de SHM et de CSR, la régulation de l'expression de AID a été essentiellement étudiée dans les LB.

1.4.1. Régulation transcriptionnelle

L'expression de AID, conditionnée à l'activation des LB, est induite soit en réponse à des signaux apportés par les lymphocytes T, comme l'engagement de la molécule CD40 par son ligand CD40L (CD154) en présence d'IL-4, soit en réponse à des signaux indépendants des cellules T, comme les ligands de TLRs et les cytokines IL-10, BAFF et APRIL qui agissent en synergie avec l'engagement du BCR (Bombardieri et al., 2011; He et al., 2004; Park et al., 2013; Pone et al., 2012; Xu et al., 2008). L'engagement de ces récepteurs sur les LB résulte en l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription qui régulent directement ou indirectement l'expression de AID.

Le séquençage génomique a permis de mettre en évidence 4 régions, notées région I, II, III et IV, dans et autour de la séquence de *aicda* qui sont très conservées chez l'homme et la souris (Crouch et al., 2007; Gonda et al., 2003; Tran et al., 2010; Yadav et al., 2006). Ces régions contiennent des sites de fixation pour un grand nombre de facteurs de transcription tels que NF- κ B, HoxC4, STAT6, Pax5, E2F, Smad ou encore C/EBP permettant de réguler l'expression de *aicda* par un jeu de balance entre activateurs et répresseurs suite à l'activation des LB (Figure 7)

1.4.1.1. La voie NF- κ B

Les signaux induisant l'activation des LB cités ci-dessus sont connus pour activer les voies classique et non-canonique de NF- κ B. Le rôle de NF- κ B dans l'activation du gène *aicda* dans les LB a été suggéré par le fait que la sous-unité p52 de la voie non-canonique de NF- κ B se lie au promoteur de AID, au niveau de la région I (Park et al., 2009) et que la sous-unité p65 de la voie canonique de NF- κ B se lie sur une région régulatrice en amont du promoteur, plus précisément dans la région IV (Tran et al., 2010) (Figure 7). Bien que la fixation de NF- κ B ait été démontrée de manière certaine son implication dans l'induction de l'expression de AID reste à éclaircir. En utilisant différentes constructions des 4 régions de *aicda*, Tran et al., ont démontré que les régions II (sur laquelle nous reviendront plus tard) et IV sont essentielles à la régulation de l'expression de AID et que le facteur NF- κ B ne semblait pas jouer de rôle majeur au niveau de ces régions.

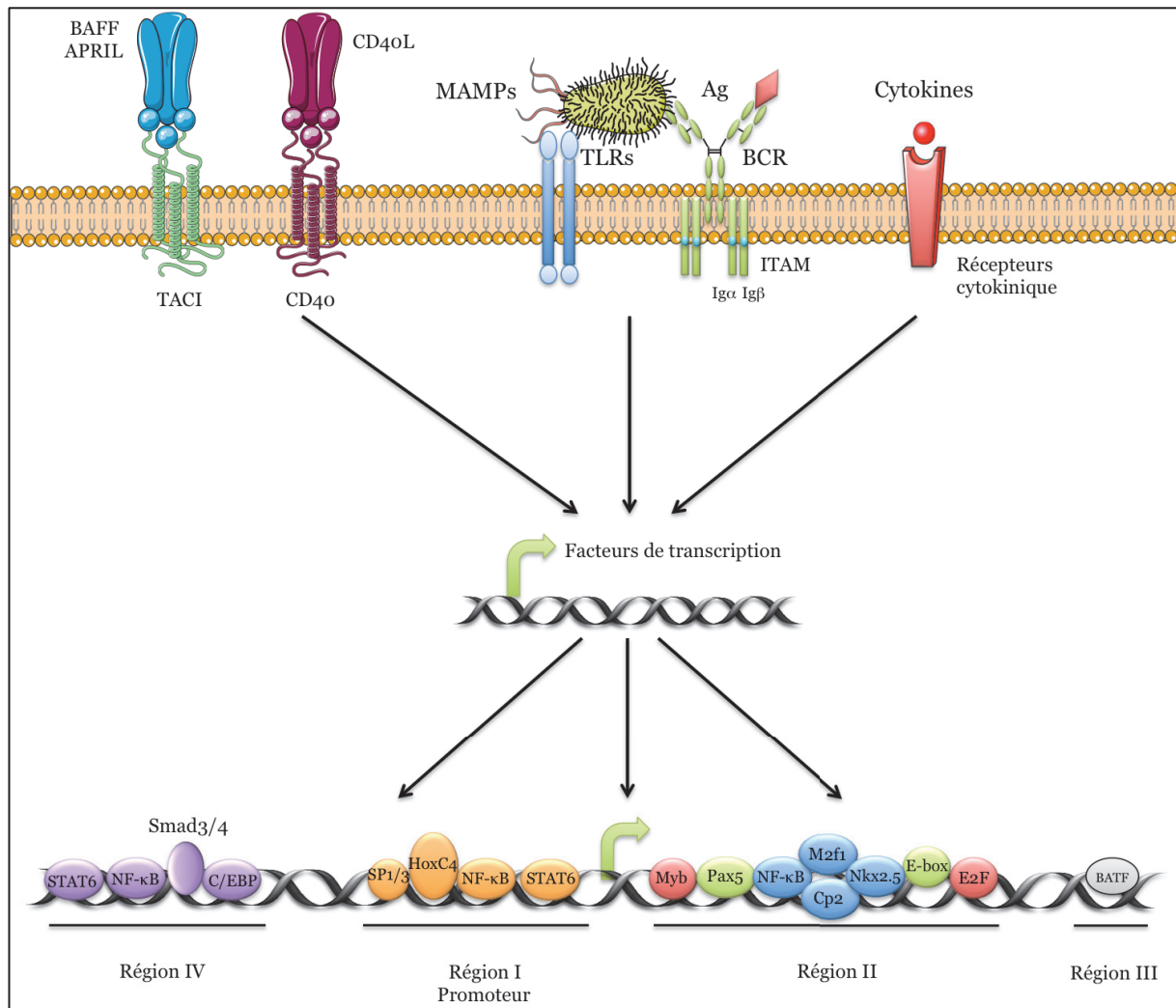


Figure 7 : Régulation de la transcription de *aicda*. Le schéma des 4 régions régulant l'activité du promoteur de *aicda* montre les sites de fixation des différents facteurs de transcription. La région I comprend une partie du promoteur ainsi que le site d'initiation de la transcription. Les régions I, II et IV comprennent des sites de fixation pour des facteurs de transcription exprimés dans la plupart des types cellulaires. La région II comprend néanmoins des sites de fixation pour Pax5 et E2F qui sont spécifiques des LB. Ces deux facteurs apparaissent comme les activateurs majeurs de la transcription de *aicda* dans les LB activés. La région II possède également des sites de fixation de Myb et E2F qui sont des inhibiteurs de la transcription de *aicda* et qui jouent un rôle important dans son inhibition dans les LB naïfs ainsi que dans les cellules non-B. L'implication de la région III dans la régulation de la transcription de *aicda* reste encore assez vague.

Des essais luciférase réalisés dans les cellules CH12F3-2 ont révélé que la région I contenue dans le cœur du promoteur de *aicda* ne répondait pas à la stimulation par CD40L, IL-4 ou encore le TGF- β , suggérant que cette région ne sert que de promoteur de base et non de région enhancer. Au sein de la région II, les sites de NF- κ B n'influent pas sur le niveau d'activation du promoteur de *aicda* à l'état basal ou après activation par l'engagement de CD40L, IL-4 ou TGF- β . En revanche, au niveau de la région IV, NF- κ B en association avec deux tandems C/EBP semble jouer un rôle important dans l'activation du promoteur (Tran et al., 2010).

Le rôle de NF- κ B est donc pour le moment très controversé et ne semble pas être d'une importance capitale dans la régulation de l'expression de AID dans les LB. En effet, NF- κ B étant exprimé de manière ubiquitaire et régulant un très grand nombre de gènes, il semble donc indispensable que d'autres facteurs de transcription assurent la spécificité de l'expression de AID dans les LB activés.

1.4.1.1. *cis*-régulation de la transcription de *aicda*

En dehors de sites de fixation pour les facteurs NF- κ B, la transcription de AID est également régulée au niveau des 4 domaines par des éléments *cis*-régulateurs sur lesquels se fixent des facteurs de transcription activés en réponse à l'activation des LB.

Parmi eux, le facteur de transcription HoxC4, activé en réponse à l'engagement de CD40L, qui se fixe directement sur le cœur du promoteur de *aicda* au niveau de la région I. HoxC4 est un facteur de transcription hautement conservé, contenant un homéodomaine hélice-loupe-hélice, qui est induit à la fois dans les cellules B chez l'homme et chez la souris par des stimuli induisant la différenciation des LB dans les GC, tels que CD40L, l'IL-4 ou encore le LPS (Park et al., 2009). La région I possède également des sites de fixation pour les facteurs STAT6 (Dedeoglu et al., 2004) et SP1/SP3 (Yadav et al., 2006) qui agissent en synergie avec HoxC4 pour activer le promoteur de *aicda* (Park et al., 2009).

Comme décrit précédemment, la région I ne répond pas à la stimulation par l'engagement de CD40L, de l'IL-4 et du TGF- β , de plus le niveau d'expression des facteurs SP1/3 ne semble pas augmenter suite à l'activation des LB confirmant que

les sites de fixation de la région I ne jouent pas de rôle clé dans la régulation de l'expression de AID.

La région II, qui se situe à l'intérieur du premier exon, contient pas moins de 14 sites de fixation pour des facteurs de transcription, 2 pour NF- κ B, 2 pour Mzf1, 2 pour Cp2, 3 pour c-Myb, 1 pour Nkx2.5, 1 pour Pax5, 1 pour E2F et 2 motifs E-box (Tran et al., 2010). Les domaines E-box ont été décrits comme capables d'induire l'expression de AID (Sayegh et al., 2003). Plus récemment, Pax5 a également été désigné comme régulateur positif de l'activité du promoteur de *aicda* (Tran et al., 2010). Les auteurs ont démontré que la mutation d'un seul des 3 sites diminuait significativement l'activité luciférase. Comme Pax5 et les protéines E sont spécifiques des LB, on peut donc supposer qu'ils soient responsables de la restriction de l'expression de AID aux LB.

La région II comporte une région de régulation négative contenant notamment les sites de fixation pour E2F, Cp2, c-Myb et Mzf1 ainsi qu'une séquence de 350pb riche en CT. Les facteurs C-Myb et E2F sont responsables de l'inhibition de l'activité du promoteur de *aicda* et agissent indépendamment l'un de l'autre pour contrecarrer l'effet positif des régions II et IV (Huong et al., 2013; Tran et al., 2010). Il semble donc très probable que la région II assure la spécificité de l'expression de AID au sein des LB.

La région IV localisée environ 9kb en amont du promoteur de *aicda* contient des sites de fixation pour NF- κ B, STAT6, C/EBP et Smad3/4 (Tran et al., 2010). Ces différents sites jouent un rôle important dans l'activation du promoteur de *aicda*. Les sites pour C/EBP sont primordiaux dans l'activation par la région IV, la délétion des deux sites de fixation pour C/EBP, abolie totalement l'activité de NF- κ B, STAT6 et Smad3/4 au niveau de la région IV (Huong et al., 2013).

La délétion de la région II ou de la région IV inhibe totalement l'expression de AID confirmant que ces deux régions sont essentielles à la régulation de l'expression de AID.

Le rôle de la région III dans la régulation de l'expression de AID reste à définir. La protéine BATF appartenant à la famille des AP-1 se lie à la région III située à 17kb en aval du promoteur (Crouch et al., 2007; Ise et al., 2011) bien que son rôle n'ait encore pu être démontré.

Les régions II et IV apparaissent donc comme les deux régions régulant l'expression de AID. La région II en particulier semble assurer l'équilibre entre induction et répression du promoteur. Tran et al., et Huong et al., avancent l'hypothèse que la région II est responsable de la restriction de l'expression de AID aux LB activés suggérant que c-Myb et E2F jouent un rôle important dans l'inhibition de l'expression de AID dans les LB naïfs et les cellules non-B (Huong et al., 2013; Tran et al., 2010). Les résultats obtenus jusqu'à présent tendent à confirmer cette hypothèse, cependant les études n'ont été menées qu'*in vitro*. Il est donc nécessaire de confirmer ces travaux *in vivo* afin de valider le modèle de régulation transcriptionnelle de l'expression de AID.

1.4.1.2. Blimp-1, un répresseur de la transcription de AID

B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) est un répresseur transcriptionnel impliqué dans la différenciation terminale des LB en plasmocytes. Une étude en microarray a démontré que Blimp-1 inhibait des facteurs essentiels à la CSR, dont AID (Shaffer et al., 2002).

Les différentes études menées sur le rôle de Blimp-1 montrent qu'il inhibe la transcription de AID d'au moins deux façons. La première en inhibant l'expression de facteurs activateurs de la transcription de *aicda* tels que Pax5, HoxC4, Irf4/8 et Stat6 (Sciammas et al., 2006; Shaffer et al., 2002). La deuxième en induisant, certainement de manière indirecte, l'expression d'antagonistes de ces activateurs telle que la protéine Id2 qui va séquestrer Pax5 et les membres de la famille E2A et ainsi inhiber l'activation du promoteur de *aicda* (Gonda et al., 2003).

1.4.2. Régulation post-transcriptionnelle de AID par les MicroARNs

Un autre niveau de régulation de l'expression de AID se fait au niveau de la stabilité de l'ARNm de AID par les microARNs. Les microARNs sont de courts ARNs sb non-codants d'en moyenne 22 nucléotides. En ciblant par complémentarité de séquence la région 3'-UTR, les microARNs empêchent la traduction des ARNm et participent à l'inhibition de l'expression de gènes. Comme environ 60% des gènes humains (Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005), les ARNs de AID sont ciblés par

les microARNs miR-155, miR-181b, miR-361 et miR-93 qui réduisent ainsi à la fois le niveau de transcrits et de la protéine AID (Basso et al., 2012; Borchert et al., 2011; Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008; Yébenes et al., 2008)

La mise en évidence du rôle des miR sur l'expression d'AID a été faite pour la première fois par la génération de souris portant une mutation dans le site de liaison de miR-155 dans la région 3'-UTR d'AID. Dans ces souris une accumulation des transcrits et de la protéine d'AID a été observée dans les cellules B de la rate et des plaques de Peyer (Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008) ce qui conduit à un processus accru de CSR et un niveau élevé de translocations Myc-IgH (Dorsett et al., 2008). De manière intéressante le répresseur de transcription Bcl6 impliqué dans la formation des CG est capable de se fixer sur le promoteur de miR-155 et de réprimer son expression favorisant ainsi l'expression de AID (Basso et al., 2012). Les auteurs de cette étude ont montré qu'un deuxième miRNA, miR-361 était réprimé par Bcl6 permettant l'accumulation de la protéine de AID (Basso et al., 2012). En 2011 Borchert et al, démontrent qu'une surexpression de miR-155 et miR-93 dans les cellules MCF-7 réduit la quantité de protéine de AID (Borchert et al., 2011). Les rôles physiologiques de miR-93 et miR-361 dans la régulation de l'expression de AID au cours des processus de SHM et CSR restent à déterminer. Un dernier miRNA semble capable de réguler l'expression de AID et d'influer sur le processus de CSR, miR-181b. En effet une expression ectopique de miR-181b dans des LB murins activés induit une diminution de la quantité d'ARNm et de protéines de AID ainsi qu'un défaut dans le processus de CSR (Yébenes et al., 2008).

1.5. Régulation post-traductionnelle de la fonction de AID

En plus d'une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, l'activité même de AID est régulée à différents niveaux, allant de sa localisation dans la cellule, à la fixation sur les séquences cibles de AID régulée par des co-facteurs, en passant par sa stabilité et son activation par phosphorylation.

1.5.1. Régulation de la localisation

Un des mécanismes de régulation post-traductionnelle de AID est l'équilibre entre sa localisation nucléaire et cytoplasmique. En effet, si la fonction de AID est exclusivement nucléaire sa localisation est, quant à elle, majoritairement cytoplasmique (Ito et al., 2004; Pasqualucci et al., 2004; Rada et al., 2002a), afin de limiter son action mutagène sur le génome (Casellas et al., 2009).

AID subit donc des aller-retour constants entre le cytoplasme et le noyau, en faveur d'un export vers le cytoplasme (Cattoretti et al., 2006; Ito et al., 2004). Malgré sa faible taille (24kDa) AID est incapable de diffuser passivement à travers les pores nucléaires. Son importation dans le noyau nécessite sa fixation via son domaine NLS à l'importin- $\alpha 3$ (Patenaude et al., 2009). La présence de AID dans le noyau est limitée par une exportation nucléaire très efficace médiée par la protéine chromosome région maintenance/exportin 1 (CRMN1) qui se lie à la séquence NES dans la région C-terminale de AID (Brar et al., 2004; Geisberger et al., 2009; Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). La localisation de AID est donc le résultat d'une compétition entre l'import médié par l'importin- $\alpha 3$ et l'export médié par CRMN1. Cependant, les signaux qui induisent la translocation de AID restent à ce jour inconnus.

Un autre mécanisme, de dégradation cette fois, permet de limiter l'accumulation de AID dans le noyau et ainsi d'empêcher AID d'exercer son activité mutagène sur l'ADN. En effet, l'utilisation de MG132, un inhibiteur du protéasome 26S, a permis de mettre en évidence que AID était adressée au protéasome après une polyubiquitination (Aoufouchi et al., 2008). En 2011, une autre étude a démontré que REG- γ , une sous-unité de l'immunoprotéasome 11S, ciblait AID et accélérail sa dégradation par le protéasome (Uchimura et al., 2011).

Dans le cytoplasme, AID apparait sous la forme d'un complexe d'environ 300 à 500kDa dont la stabilité stœchiométrique est assurée par le facteur 1 α (eEF1A). La formation de ce complexe pourrait prévenir à la fois de la dégradation et de l'import dans le noyau (pour revue (Häsler et al., 2012)). Enfin, une récente étude démontre que la stabilité de AID est également assurée par la protéine chaperonne heat shock protein 90kDa (HSP90) prévenant ainsi sa polyubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Orthwein et al., 2010).

L'export permanent et la stabilisation de AID dans le cytoplasme sont donc deux des moyens majeures mis en place par la cellule pour limiter l'activité mutagène de AID sur le génome.

1.5.2. Phosphorylation de AID

Un niveau supplémentaire de régulation de l'activité de AID semble être lié à son statut phosphorylé ou non. En effet, Chaudhuri et al., ont démontré que l'ADN était efficacement désaminé par AID lorsque l'enzyme était sous forme phosphorylée (Chaudhuri et al., 2004). De façon intéressante, il a été démontré que lorsque AID est exprimée dans des cellules autres que les LB, son niveau de phosphorylation est nettement inférieur à celui observé lorsque AID est purifiée à partir de cellules B activées de rate de souris (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004; McBride et al., 2006).

Une étude en spectrométrie de masse de la protéine AID purifiée à partir de LB subissant la CSR a démontré que AID est phosphorylée sur deux résidus : la Ser38 et la Tyr184. La Ser38 est phosphorylée par la protéine kinase A (PKA) (Basu et al., 2005; McBride et al., 2006). Cette phosphorylation ne semble survenir que dans les LB et non dans les cellules non-B (Basu et al., 2005).

En 2009, Vuong et al., démontrent que la fixation de AID au niveau des régions S ne dépend pas de son statut de phosphorylation (Vuong et al., 2009). La protéine PKA serait recrutée spécifiquement au niveau des régions S afin de phosphoryler AID au niveau de ces régions (Vuong et al., 2009).

De plus, la phosphorylation de AID semble conditionnée à la présence de DSB. En effet, dans les LB déficients pour UNG-MSH2, et donc incapables de générer des DSB, ou dans des LB dont le domaine catalytique de AID est déficient, et donc incapable de générer des dUs, AID se lie correctement aux régions S mais n'est pas phosphorylée et ne peut se lier à APE1. L'ajout de UNG-MDH2 dans ces cellules restaure la phosphorylation de AID (Vuong et al., 2013). Ces données montrent donc que AID ne peut être phosphorylée que dans un contexte d'instabilité chromosomique comme c'est le cas dans les LB activés.

De manière surprenante et alors qu'on pensait que la phosphorylation était indispensable à l'activité désaminase de AID, il semblerait que l'enzyme est une

activité désaminase basale qui est potentialisée par les DSB qui forment une boucle de rétrocontrôle positif permettant à AID de désaminer plus efficacement et de recruter les protéines nécessaires à la génération de DSB. On peut alors penser que pour générer les premières DSB, APE1 va passivement se fixer sur les sites abasiques pour exciser l'ADN.

La phosphorylation de AID sur la Ser38 est indispensable à l'interaction entre AID et la sous-unité de 32kDa de la protéine A de réplication (RPA), qui va potentialiser l'activité déaminase (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004). En revanche, le rôle physiologique de la phosphorylation de la Tyr184 reste inconnu à ce jour.

1.5.3. Co-facteurs de AID

L'activité de AID au niveau des loci des Ig est également régulée par l'interaction avec de nombreux co-facteurs.

Comme décrit plus haut, dans les LB activés, la forme phosphorylée de AID va interagir avec la protéine RPA qui va potentialiser et cibler l'activité de AID au niveau des régions transcrites lors des processus de SHM et de CSR (Chaudhuri et al., 2004). RPA va notamment stabiliser AID sur l'ADNsb généré au cours de la transcription des Igs. Après phosphorylation sur la Ser38, un complexe AID-RPA-PKA a été retrouvé sur les régions S des Igs, au niveau des séquences 5'-AGCT-3', au cours de la CSR (Vuong et al., 2009). Cependant, le rôle précis de RPA au cours du processus de CSR reste assez vague. Une étude a montré que dans les cellules B AID^{S38A} ou la sérine en position 38 est remplacée par une alanine, abolissant la phosphorylation de AID sur ce site, le défaut de CSR n'est pas du à l'incapacité de AID à se fixer au niveau des régions S mais probablement à son incapacité de recruter RPA (Vuong et al., 2009). RPA est capable d'interagir avec les protéines 53BP1 et H2AX (Chaudhuri et al., 2007), deux facteurs recrutés au niveau des DSB afin de promouvoir la formation de synapses S-S lors de la CSR. Ces données suggèrent que RPA pourrait agir en aval de la déamination en recrutant la machinerie permettant la conversion des dUs en DSB.

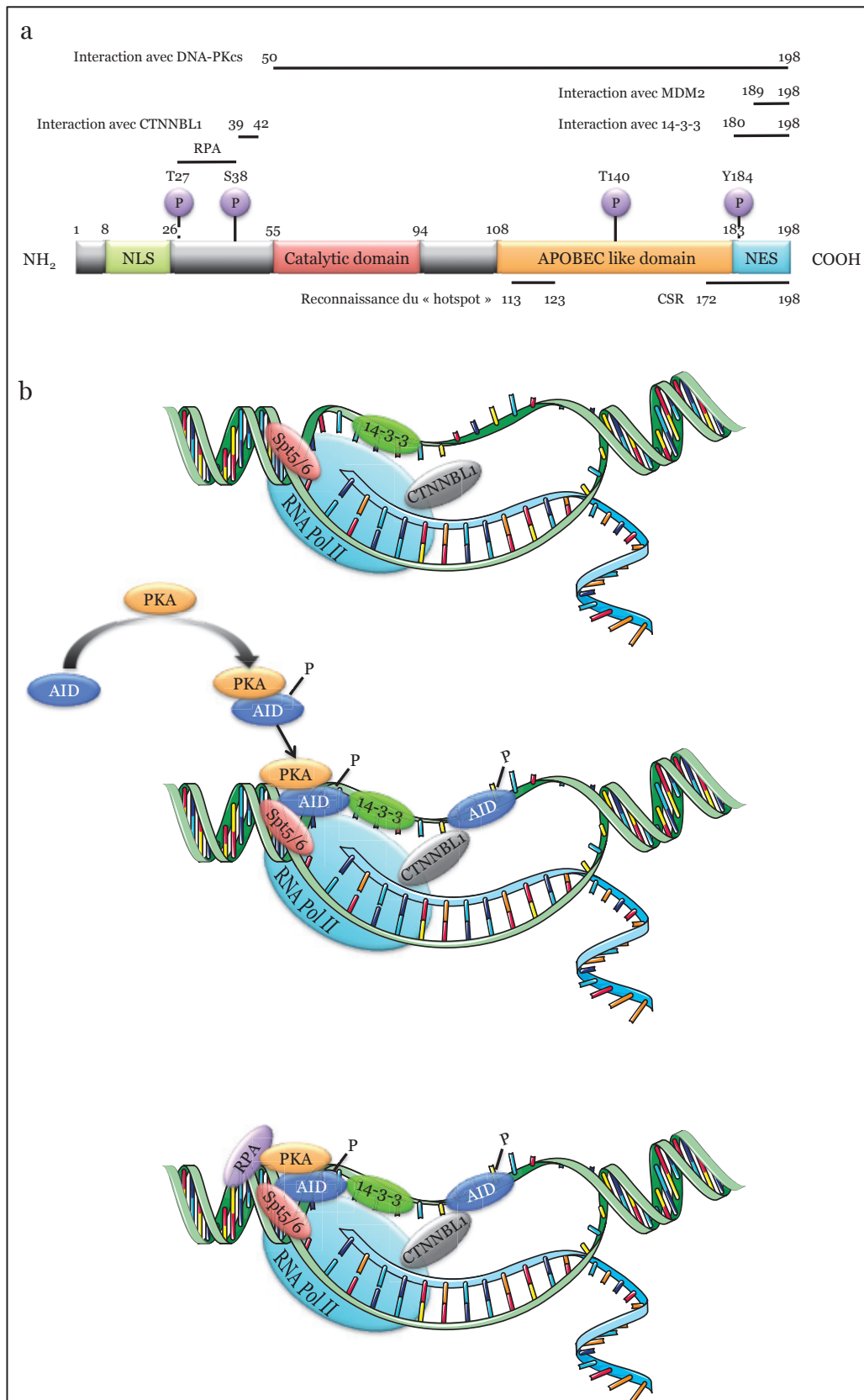


Figure 8 : co-facteurs régulant l'activité de l'ADNsb. a, schéma de la structure primaire de AID montrant les zones d'interaction avec ses principaux co-facteurs RPA, CTNNBL1, 14-3-3, MDM2 et DNA-PKc. b, L'adaptateur 14-3-3 recrute AID au niveau des séquences 5'-AGCT-3' lors de la transcription par la RNA Pol II. AID est phosphorylé sur Ser38 par PKA ce qui va permettre l'interaction de AID avec la protéine RPA. RPA potentialise l'activité déaminase de AID. De plus en se liant à la RNA Pol II le facteur Spt5 va également être capable de recruter AID au niveau de l'ADNsb. AID va ainsi pouvoir désaminer les dCs en dUs.

Un autre co-facteur potentiel est la protéine 14-3-3 dont l'expression est augmentée dans les cellules B activées. Il a été démontré que cette protéine se liait au niveau du domaine C-terminal de AID permettant ainsi son recrutement sur l'ADNsb au niveau des séquences 5'-AGCT-3' (Xu et al., 2010). Récemment, plusieurs études suggèrent que la protéine 14-3-3 pourrait aussi recruter l'UNG et la PKA et ainsi favoriser les processus de SHM et la CSR (Lam et al., 2013; Vuong et al., 2009).

Plusieurs études se sont intéressées à l'implication des protéines de la machinerie transcriptionnelle dans le recrutement et/ou l'activité de AID. En 2003, une interaction entre AID et la RNA polymérase II a été mise en évidence (Nambu et al., 2003) sans pour autant pouvoir corréler de rôle physiologique à cette interaction. AID est également capable de se lier à des protéines régulant la transcription, tels que les homologues des suppresseurs de Ty 5 et 6 (Spt5/6) (Okazaki et al., 2011; Pavri et al., 2010), qui sont capables d'interagir avec l'ADN et la RNA Pol II afin de stabiliser la RNA Pol II sur l'ADN. En 2008, une nouvelle protéine, CTNNBL1, appartenant au RNA Pol II spliceosome, a été identifiée comme interagissant avec AID (Conticello et al., 2008).

Ces avancées suggèrent que AID pourrait coopérer avec la machinerie transcriptionnelle afin de suivre l'avancée de la fourche de transcription et se lier à l'ADNsb généré.

Comme nous venons de le voir, l'expression et l'activité de AID sont donc très finement régulées afin de maintenir l'intégrité du génome et de favoriser le développement d'une réponse humorale robuste.

Dans les LB naïfs, les facteurs c-Myb et E2F agissent comme des répresseurs de l'activation du promoteur de *aicda* et assurent la répression du promoteur dans les cellules non-B. Suite à l'activation des LB, la régulation de l'expression de AID résulte d'un équilibre entre les activateurs Pax5 et E2F et les répresseurs Blimp-1 et Id2. A contrario, comme nous le verrons plus loin (paragraphe 1.6), dans les cellules non-B, la voie NF- κ B semble être l'activateur majeur de *aicda*, en particulier suite à une infection (Gourzi et al., 2007; Matsumoto et al., 2007).

L'activité de AID, quant à elle, est régulée par 3 mécanismes distincts i) la navette noyau/cytoplasme, ii) le recrutement sur l'ADNsb par des co-facteurs, iii) la phosphorylation au niveau de la Ser38, qui semble restreinte aux LB. La raison de

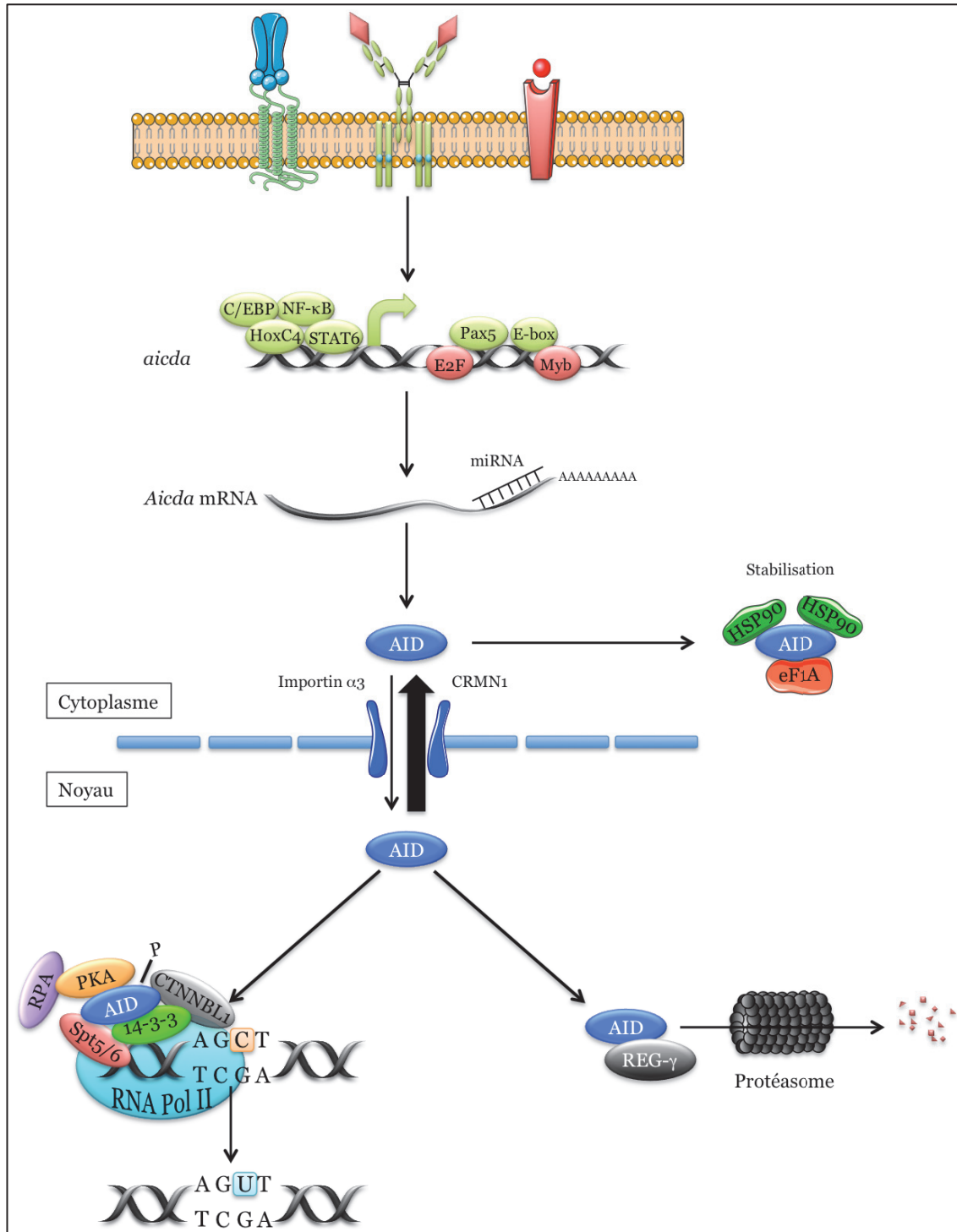


Figure 9 : Schéma bilan de la régulation de l'expression et de l'activité de AID. Dans les LB naïfs, les facteurs Myb et E2F répriment la transcription de *aicda*. L'activation des LB va induire l'expression et l'activation de facteurs de transcriptions permettant la transcription de *aicda*. Après la transcription les ARNm de *aicda* sont régulés négativement par les microRNA, tels que miR-155 et miR-181b qui se fixent au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm. La protéine de AID va subir plusieurs régulations post-transcriptionnelle telles que l'oligomérisation, la translocation nucléaire/cytoplasmique, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, régulant ainsi son activité sur le génome. La dégradation de AID dans le noyau est ubiquitine-indépendante et fait intervenir la protéine REG-γ. AID va être phosphorylée par la PKA et recrutée sur l'ADN par les facteurs 14-3-3 et CTNNB1 au niveau de la fourche de lecture ouverte par la RNA Pol II. L'adaptateur 14-3-3 permet de recruter et stabiliser AID au niveau des séquences 5'-AGCT-3' qui sont les cibles de AID. AID va ainsi pouvoir désaminer les dCs en dUs, étape nécessaire aux processus de SHM et de CSR.

cette restriction reste aujourd'hui inconnue, mais le fait que AID joue un rôle dans la tumorigenèse de cellules non-B suggère que sous certaines conditions, AID pourrait être phosphorylée dans ces cellules. Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 1.5.2., AID est phosphorylée efficacement en présence de DSB. L'infection ou l'inflammation chronique génère un contexte de stress dans lequel des DSB peuvent apparaître. Cet état de stress pourrait être le déclencheur de la phosphorylation de AID dans les cellules non-B.

A ce jour, l'intégralité des études sur la régulation de l'expression et de l'activité de AID a été menée dans les LB. Il a également été démontré que AID est physiologiquement exprimée dans les CSE et les CPG, cellules dans lesquelles AID joue un rôle dans le contrôle de la déméthylation de l'ADN. Cependant les mécanismes régulant à la fois son expression et son activité dans ces cellules restent inconnus. On peut penser que la modification du profil de méthylation de l'ADN et les changements de conformation de l'ADN au cours de ces processus générant des SSB et DSB peuvent, comme dans les LB, potentialiser l'activité de AID. Le modèle de déméthylation basé sur une désamination puis une excision par la voie du BER/MMR générant des DSB pourrait exercer un rétrocontrôle positif sur la phosphorylation de AID. Il serait donc intéressant d'étudier le profil de phosphorylation de AID dans ces cellules et de regarder si des protéines kinases comme PKA sont exprimées et interagissent avec AID.

1.1. Rôle de AID dans l'instabilité génétique et la tumorigenèse

1.1.1. AID et hémopathies malignes B

Les LB au sein des GC subissent simultanément une prolifération massive et des endommagements de l'ADN du fait des processus de SHM et CSR liés à l'activité de AID. Bien que les voies de réparation de l'ADN maintiennent l'intégrité du génome, l'action de AID peut donner lieu à l'apparition de mutations et/ou de translocations. Le potentiel oncogénique de AID réside dans sa capacité à créer des lésions au niveau de l'ADN (SSB et DSB) en dehors des loci des Igs. On sait aujourd'hui qu'environ 95% des lymphomes sont des lymphomes B et qu'une grande majorité dérive des LB issus des GC, qui expriment AID (Küppers, 2005).

Bien que l'activité de AID dans les cellules B au niveau des loci des Igs soit très finement régulée, des études ont démontré que AID était capable de générer des mutations sur d'autres loci que ceux des Igs (Parsa et al., 2007; Wang et al., 2004). De plus les translocations chromosomiques impliquant la région S, impliquée dans la CSR des Igs, sont une des caractéristiques des cellules B malignes.

Le rôle de AID comme agent mutagène dans les LB a donc très vite été envisagé et étudié. De nombreuses études ont été menées sur des lymphomes B dérivant des GC tels que les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), des lymphomes B folliculaires (FL) et des lymphomes de Burkitt (BL). Ces études ont démontré que AID était constitutivement exprimée dans ces lymphomes (Faili et al., 2002; Greeve et al., 2003; Hardianti et al., 2004a, 2004b; Pasqualucci et al., 2001; Smit et al., 2003).

Les translocations les plus courantes dans ces types de lymphomes sont les translocations entre les loci des IgH et ceux de proto-oncogènes comme *Bcl-6*, *Bcl-2* et *c-Myc*, provenant en général d'un processus de CSR aberrant (pour revue (Küppers and Dalla-Favera, 2001)). Le rôle de AID dans ces translocations a été clairement mis en évidence dans des souris Balb/C IL-6tg AID^{-/-} dans lesquelles aucune translocation IgH/*c-Myc* n'est observée (Ramiro et al., 2004, 2006).

Les translocations chromosomiques ne sont pas les seuls événements transformants induits par AID. En effet plusieurs études ont démontré que différents gènes autres que les Igs sont porteurs d'un nombre important de mutations

somatiques dans des LB GC (*Bcl-6*, *Fas*, *CD79A* et *CD79B*) (Gordon et al., 2003; Muschen et al., 2000; Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998) ainsi que dans des cellules tumorales telles que les DLBCL (*Bcl-6*, *c-myc*, *Pim1*, *Pax5* et *RhoH* ; (Migliazza et al., 1995; Pasqualucci et al., 2001; Ramiro et al., 2006; Rossi et al., 2006).

Partant de ces observations Liu et al. ont réalisé un séquençage à large échelle d'un grand nombre de gènes des cellules B de plaques de Peyer et ont montré qu'environ 50% des gènes étudiés présentaient des traces de désamination mais que seulement 25% de ces gènes accumulaient des mutations et présentaient des transitions dC:dG→dT:dA similaires à celle induite par AID lors du processus de SHM (Liu et al., 2008a). Cependant, le taux de mutations est environ 30 fois inférieur à celui retrouvé sur les gènes des Igs pour les gènes *Bcl-6* et *Cd83* et 100 fois inférieur pour le reste des gènes. En revanche dans les cellules B du GC issues de souris *Ung/Msh2*^{-/-} la plupart des gènes étudiés y compris *c-myc* et *p53* présente un nombre accru de transitions dC:dG→dT:dA (Liu et al., 2008a). Ces données tendent à montrer que dans un contexte physiologique les mutations induites par AID en dehors des loci des Igs sont efficacement corrigées pour la plupart des gènes, et que l'apparition de mutations serait conditionnée à la fidélité de la réparation de l'ADN.

Supportant cette hypothèse, Ramiro et al., mettent en évidence qu'une perte de l'expression de *p53* favorise la lymphomagenèse, en favorisant les mutations et translocations induites par AID dans les LB (Ramiro et al., 2006).

En accord avec les résultats de Liu et al., qui démontrent que *p53* est muté dans les lymphomes B et ceux de Ramiro et al., indiquant que l'absence de *p53* favorise la lymphomagenèse on peut en déduire que la transformation cellulaire induite par AID est favorisée dans un contexte *p53* déficient.

AID est également constitutivement exprimée dans les LPHL (Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Lymphoma) probablement dérivés des LB issus des GC. Il semblerait que l'expression de AID dans les cellules lymphocytaires et histiocytaires joue un rôle important dans la transformation des LPHL indolents en un DLBCL agressif en générant des mutations supplémentaires (Greiner et al., 2005; Mottok et al., 2005).

AID est également exprimée dans des hémopathies malignes B qui ne dérivent pas de LB issus des CG, comme la leucémie lymphoïde chronique à cellules B (B-CLL), leucémie la plus commune en occident qui dérive de cellules B naïves, donc n'ayant pas subi les processus de CSR et de SHM. Cette notion a été quelque peu remise en cause depuis qu'il a été démontré qu'environ 50% des B-CLL exprimaient des gènes IgV_H mutés (Schroeder and Dighiero, 1994).

Les B-CLL peuvent être divisées en deux groupes, l'un correspondant aux B-CLL portant des mutations au niveau IgV_H et l'autre correspondant aux B-CLL non mutées, les B-CLL mutées ayant un meilleur pronostic (Damle et al., 1999; Schroeder and Dighiero, 1994).

De manière très surprenante AID est constitutivement exprimée dans les B-CLL non-mutées (Albesiano et al., 2003; Cerutti et al., 2002; Heintel et al., 2004; Oppezio et al., 2003) mais pas dans les B-CLL mutées. Les profils d'expression en microarray de ces deux sous-types de B-CLL semblent relativement identiques (Klein et al., 2001; Rosenwald et al., 2001) aussi l'implication de AID dans le mauvais pronostic des B-CLL non-mutées reste à démontrer. De plus différents variants de AID sont exprimés dans les B-CLL non-mutées. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des ces différents variants dans la tumorigenèse.

Deux études ont montré que les B-CLL non-mutées qui expriment fortement AID présentent un taux de CSR élevé indépendamment de toute stimulation (Cerutti et al., 2002; Oppezio et al., 2003). Récemment une étude menée chez des patients atteints de B-CLL a montré qu'une expression de AID pouvait être associée à des délétions au niveau des chromosomes 17p13, 11q22.3 et 13q14 (Gelmez et al., 2014). Ces datas suggèrent que dans les B-CLL non-mutées, exprimant AID, le mauvais pronostic pourrait être le résultat de translocations chromosomiques impliquant des proto-oncogènes, dues à une CSR aberrante.

Enfin, des études ont montré que AID était constitutivement exprimée dans des hémopathies malignes B autres que les lymphomes B dérivés des CG ou les B-CLL. En particulier, une expression constitutive de AID a été retrouvée dans les lymphomes du MALT dans les muqueuses, dans les immunocytomes dérivant des plasmocytes, des leucémies à tricholeucocytes dérivés de LB mémoires (Forconi et al., 2004; Greeve et al., 2003; Smit et al., 2003). Ces données suggèrent que AID peut

être exprimée dans des leucémies et lymphomes dérivés de LB à différents stades de différenciation.

La présence de AID dans ces différents types d'hémopathies malignes dérivées ou non des CG renforce l'idée que AID joue un rôle dans l'initiation ou la progression de ces pathologies et peut être considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans un grand nombre de lymphomes et leucémies B. En effet une forte expression de AID dans une sous-population de B-CLL induit une CSR accrue et est associée au processus de SHM au niveau des gènes *c-Myc*, *Pax5* et *RhoH*, ainsi qu'à une progression vers une forme plus agressive de lymphome (Palacios et al., 2010; Reiniger et al., 2006).

De plus l'expression de AID a été corrélée à un mauvais pronostic dans un sous-groupe de DLBCL (Pasqualucci et al., 2004). Les DLBCL peuvent être divisés en 3 groupes que nous ne détaillerons pas ici. Le sous-groupe possédant la plus forte expression de AID est également celui qui a le plus mauvais pronostic.

Enfin il a été montré que les formes de FL ayant une progression clinique péjorative expriment fortement AID et évoluent vers une forme agressive de DLBCL (Smit et al., 2003).

AID jouerait donc un rôle dans la progression tumorale et pourrait être un marqueur de mauvais pronostic dans certaines formes d'hémopathies malignes B.

1.1.2. Cancers associés à des inflammations chroniques

Le lien entre cancer et inflammation est connu depuis de nombreuses années. Alors qu'à l'origine l'inflammation était considérée comme une conséquence du cancer, il apparaît aujourd'hui clairement qu'un contexte inflammatoire, et en particulier des inflammations chroniques, liées ou non à des agents infectieux, peuvent promouvoir le développement de carcinomes, notamment des cancers du tractus digestif (Lin and Karin, 2007; Mantovani et al., 2008).

Les cellules cancéreuses se caractérisent par l'accumulation de mutations, de modifications du nombre de copies de certains gènes et des translocations chromosomiques acquises tout au long de la tumorigenèse. Le facteur de transcription NF- κ B, qui est capable d'induire l'expression de AID, est un facteur clé

dans le développement de cancers associés à une inflammation chronique. De plus la capacité de AID à induire des mutations et des DSBs dans les hémopathies malignes, à très vite mis AID au premier plan dans la tumorigenèse associée à une inflammation chronique des cellules épithéliales du tractus digestif. Plusieurs études ont révélé que l'inflammation des tissus induite ou non par un agent pathogène était suffisante à l'induction de l'expression de AID suggérant l'implication de AID dans l'instabilité génomique des cellules épithéliales lors de l'inflammation

1.1.2.1. Colitis-associated colorectal cancer

L'incidence du cancer colorectal est significativement plus élevée chez les patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin telles que la colite ulcéreuse (CU) (Erdman and Poutahidis, 2010), ou la maladie de Crohn, que dans le reste de la population (Podolsky, 2002). Le cancer colorectal associé à une colite (CAC) est différent du cancer colorectal sporadique qui provient de polypes adénomateux colorectaux. Ce dernier est marqué par l'inactivation du gène *APC* suivi par de nombreuses altérations génétiques conduisant notamment à l'activation de *K-ras* et à l'inactivation de *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma) et *p53* (Fearon et al., 1990; Kikuchi-Yanoshita et al., 1992a, 1992b; Kinzler and Vogelstein, 1996; Smith et al., 2002).

A l'inverse les mutations au niveau de *p53* sont un évènement précoce chez les patients atteints de CU (Hussain et al., 2000; Kern et al., 1994; Yin et al., 1993). Une étude en immunohistochimie a révélé la présence de la protéine AID dans les cellules épithéliales de la muqueuse colique de patients atteints de CU (Endo et al., 2008). L'expression de AID a également été détectée dans les néoplasmes associés à des colites, alors qu'aucune trace de AID n'a été observée dans les tissus non inflammatoires de patients sains, suggérant que l'expression de AID est induite dans les cellules épithéliales de patients présentant une inflammation chronique ainsi que chez ceux développant un CAC.

En accord avec cette hypothèse, Endo et al. ont démontré que la culture de cellules épithéliales coliques en présence de $\text{TNF-}\alpha$ induisait l'expression de AID via la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Endo et al., 2008). La voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$ est constitutivement activée dans

les cellules épithéliales coliques de patients présentant des inflammations chroniques de l'intestin (Sartor et al., 2006) ce qui pourrait expliquer l'expression de AID.

L'inflammation chronique de la muqueuse colique est généralement induite par une réponse T, de type Th1, accompagnée d'une sécrétion d'IFN- γ et d'IL-12 dans le cas de la maladie de Crohn ou à une réponse T (Fuss et al., 1996; Monteleone et al., 1997; Parronchi et al., 1997), de type Th2, accompagnée par une sécrétion d'IL-13 dans le cas de la CU (Heller et al., 2005; Inoue et al., 1999). De façon intéressante, une analyse par immunoblotting a démontré que la culture de cellules épithéliales coliques humaines normales en présence des cytokines de type Th2, IL-4 et IL-13 induisait l'expression de AID (Endo et al., 2008). L'utilisation de siRNA spécifiques du facteur de transcription STAT6 inhibe l'induction de AID par ces cytokines, démontrant ainsi que la voie NF- κ B n'est pas la seule à induire l'expression de AID, mais que IL-4 et IL-13 peuvent aussi induire l'expression de AID via la voie STAT6 dans les cellules épithéliales coliques (Endo et al., 2008). Les conséquences potentielles de l'expression aberrante de AID dans ces cellules ont été étudiées dans des cellules coliques exprimant AID de manière constitutive. Un grand nombre d'altérations au niveau de *p53* a été observé alors qu'aucune altération nucléotidique n'a été retrouvée au niveau des gènes *APC* ou *K-ras* (Endo et al., 2008). Ces résultats sont cohérents avec le fait que *p53* est muté dans les CAC associés à CU mais pas *APC* ni *K-ras*.

Une étude récente a clairement démontré l'incidence de AID in vivo sur le développement de CAC. Les auteurs ont démontré que malgré un contexte inflammatoire, les souris IL-10(-/-)AID(-/-) exhibent un taux de mutations au niveau de *p53* significativement inférieur que dans les souris IL-10(-/-)AID(+/-). De plus les souris IL-10(-/-)AID(-/-) ne forment aucun CAC alors que près de 30% des souris IL-10(-/-)AID(+/-) forment spontanément des CAC (Takai et al., 2012). AID apparaît donc comme un agent génotoxique induit par des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales coliques associées à une CU conduisant un grand nombre de mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53* ou de proto-oncogènes favorisant ainsi le développement de CAC.

1.1.2.2. Hépatocarcinome

Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est un cancer primitif du foie qui survient presque toujours en aggravation d'une maladie chronique pré-existante, le plus souvent une cirrhose, mais aussi à la suite d'hépatites chroniques souvent virales dont l'agent causal est le virus de l'hépatite C (HCV).

Les cellules d'HCC présentent fréquemment des mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs comme *p53* (Hussain et al., 2007). Des mutations ont également été retrouvées au niveau du gène *p53* dans les cellules hépatiques de patients présentant un hépatite chronique bien avant le développement de HCC (Kou et al., 2007), suggérant que les hépatocytes de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques accumulent un certain nombre d'altérations génétiques pouvant conduire au développement de cancer. Cependant les mécanismes moléculaires faisant progresser les cellules vers un stade tumoral lors d'une inflammation chronique restent encore méconnus.

De manière très intéressante les transcrits de AID ont été retrouvés dans les hépatocytes de patients atteints de cirrhose, ou d'hépatite chronique alors qu'aucune trace de AID n'a été détectée dans les hépatocytes de patients sains (Kou et al., 2007). Une étude en immunohistochimie a révélé la présence de la protéine AID dans les hépatocytes de foies présentant une inflammation chronique due à l'infection par HCV mais pas dans les hépatocytes de foies contrôles (Kou et al., 2007). Ces données confirment que l'expression de AID retrouvée par RT-PCR dans les foies de patients atteints d'inflammation chronique est bien due à une expression dans les hépatocytes et non à une infiltration de cellules B au niveau des sites d'inflammation.

De la même façon que dans les cellules épithéliales coliques, Endo et al., ont démontré que le TNF- α induisait in vitro l'expression de AID dans les hépatocytes humains (Endo et al., 2007).

L'utilisation d'I κ B α , un inhibiteur de la voie NF- κ B, réprime l'induction de AID en réponse à une stimulation par le TNF α . A l'inverse, l'utilisation de régulateurs positifs de NF- κ B, IKK α , IKK β ou NF- κ B lui-même induit l'expression de AID (Endo et al., 2007).

Ces données confirment que l'induction de AID par le $\text{TNF}\alpha$ se fait via la voie NF- κ B. Ces données sont cohérentes avec une étude précédente démontrant que la protéine core de HCV est capable d'activer NF- κ B dans les hépatocytes (Marusawa et al., 1999) indiquant que l'expression de AID serait induite à la fois par le $\text{TNF-}\alpha$ lors d'inflammation chronique et par la protéine core de HCV.

L'expression de AID *in vitro* dans des cellules dérivant d'hépatocytes conduit à l'accumulation d'altérations génétiques notamment au niveau du gène suppresseur de tumeur *p53* ou de proto-oncogènes comme *c-myc* et *pim1* (Endo et al., 2007). Afin de tester le rôle de AID *in vivo* sur le développement de HCC, Takai et al. ont développé un modèle de souris TNAP-AID permettant une expression constitutive de AID restreinte aux hépatocytes. La TNAP (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase) est un marqueur de cellules souches embryonnaires et est exprimée dans les cellules de foie fœtal. Environ 27% des souris TNAP-AID développent des HCC à un âge moyen de 90 semaines (Takai et al., 2009). De plus une accumulation de mutations au niveau du gène *p53* a été observée à la fois dans les HCC et dans les tissus hépatiques non-cancéreux des souris TNAP-AID (Takai et al., 2009).

Ces études suggèrent que AID va agir comme agent mutagène permettant l'accumulation de mutations au niveau de gènes associés à des tumeurs dans les hépatocytes.

AID apparaît ainsi comme le lien entre inflammation chronique et développement de l'HCC. L'utilisation de souris AID(-/-) permettrait de clairement établir l'implication de AID dans les altérations génétiques des hépatocytes et le développement de HCC.

1.1.2.3. Cancer gastrique

Le cancer gastrique, aussi appelé adénocarcinome de l'estomac, est un cancer qui se développe à partir des glandes de la muqueuse de la paroi stomacale. Le cancer gastrique se développe généralement dans un contexte inflammatoire de gastrites chroniques ou d'ulcères gastriques. Les données de la littérature suggèrent aujourd'hui qu'au moins 95% de ces inflammations gastriques chroniques ont pour origine une infection par la bactérie *Helicobacter pylori* (Chiba et al., 2008; Shiotani et

al., 2013). Cependant les mécanismes moléculaires conduisant au développement d'adénocarcinome restent mal définis.

L'étude de souris AID-transgéniques (AID-Tg) dont l'expression de AID est constitutive et ubiquitaire, sous le contrôle du promoteur de la β -actine du poulet, a révélé que certaines d'entre elles développaient des cancers gastriques suggérant que l'expression de AID dans les cellules épithéliales gastriques favoriserait l'accumulation de mutations et ainsi le développement de cancers gastriques (Matsumoto et al., 2007). Matsumoto et al. ont mis en évidence la première preuve de l'implication de AID dans l'évolution de gastrite chronique en adénocarcinome. Ils ont détecté l'expression de AID à la fois dans les cellules épithéliales de l'estomac de patients atteints de gastrite chronique induite par *H. pylori* et dans les cellules d'adénocarcinome mais pas dans les cellules épithéliales normales ou dans les cellules épithéliales gastriques après éradication de *H. pylori* (Matsumoto et al., 2007).

In vitro, tout comme cela a été démontré dans les hépatocytes et les cellules épithéliales coliques, l'expression de AID est induite dans les cellules épithéliales gastriques en réponse à l'ajout de $\text{TNF}\alpha$ via la voie classique de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Matsumoto et al., 2007). De plus l'infection par *H. pylori* induit directement l'activation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les cellules épithéliales gastriques (Keates et al., 1997; Naumann, 2001) indiquant que l'expression de AID dans ces cellules peut se faire soit par la voie du $\text{TNF-}\alpha$ soit par l'activation directe de la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$ par *H. pylori*. L'infection in vitro de cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* conduit à l'accumulation de mutations au niveau du gène suppresseur de tumeur *p53*.

Afin de confirmer le rôle de AID dans l'accumulation de mutations au niveau du gène *p53*, les auteurs ont établi un système permettant in vitro l'expression conditionnelle de AID dans les cellules épithéliales gastriques en réponse à l'ajout d'un analogue d'oestrogène. Dans ce modèle l'induction de l'expression de AID est associée à l'accumulation de mutations au niveau de *p53*. En revanche l'invalidation de l'expression de AID par l'utilisation de siRNA dans les cellules épithéliales gastriques, réduit significativement la fréquence des mutations au niveau de *p53* lors de l'infection par *H. pylori*. Ces résultats démontrent que AID est responsable de l'accumulation de ces mutations au niveau du gène *p53* dans les cellules épithéliales gastriques infectées par *H. pylori*.

Ces résultats suggèrent que AID est induit par la voie NF- κ B en réponse à l'infection par *H. pylori* ou à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et induit des mutations somatiques dans des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes favorisant la transformation cellulaire. Une analyse en microarray d'hybridation génomique comparative a révélé l'accumulation de micro-délétions dans la plupart des chromosomes des cellules épithéliales gastriques en culture exprimant AID, résultant en la perte du nombre de copies de nombreux loci (Matsumoto et al., 2010).

De manière intéressante l'expression de AID dans les cellules épithéliales gastriques induit des micros-délétions au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs *CDKN2A*, *CDKN2B* et *BCL-6*. L'infection par *H. pylori* conduit à une diminution du nombre de copie de *CDKN2A-2B* dans les muqueuses gastriques de souris WT mais pas dans les souris AID-déficientes (Matsumoto et al., 2010). Ces données sont en accord avec une étude précédente qui a démontré que l'expression de AID dans les cellules leucémiques induisait des SSB au niveau du gène *CDKN2B* (Feldhahn et al., 2007) et des délétions au niveau de *CDKN2A-2B* dans les lymphoid blast crisis leukemia cells (Klemm et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent clairement que l'expression de AID observée dans le contexte d'une infection par *H.pylori* va induire des mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs qui peuvent être à l'origine des altérations chromosomiques dans les cellules de la muqueuse gastrique au cours de la carcinogenèse.

1.1.2.4. Cholangiocarcinome

Le cholangiocarcinome (CC) est un cancer qui se développe à partir de cellules épithéliales des voies biliaires intra- et extra-hépatiques ainsi que de la vésicule biliaire. Ce cancer est relativement rare avec une évolution rapide et un très mauvais pronostic. Dans la plupart des cas, les cholangiocarcinomes se développent sans trace de facteur aggravant. Cependant dans certains cas parasitoses et inflammations chroniques de l'épithélium biliaire apparaissent comme des facteurs de risque dans le développement de ce cancer (Patel, 2006). L'angiocholite sclérosante ou cholangite sclérosante primaire (CSP) est la maladie inflammatoire chronique des voies biliaires

la plus communément associée au développement de CC avec une prévalence allant de 9 à 23% (Bergquist et al., 2002; Gores, 2003). Dans les pays orientaux des parasitoses telles que la distomatose à *Opisthorchis viverrini* ou à *Clonorchis sinensis* sont plus fréquemment associées à un CC (Watanapa and Watanapa, 2002). Comme les autres cancers gastro-intestinaux décrits dans ce chapitre, l'expression de AID a été observée dans les cellules épithéliales biliaires des patients atteints de CSP ainsi que dans les cellules de CC (Komori et al., 2008). *In vitro* l'expression de AID est up-régulée par l'addition de TNF- α via la voie NF- κ B. La présence de AID dans les lignées cellulaires de CC humains conduit à l'accumulation de mutations au niveau des gènes *p53* et *CDKN2A-2B*, qui sont fréquemment mutés dans les CC humain associés à une CSP (Komori et al., 2008; Tanai et al., 2002; Yang et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'expression de AID induite par l'inflammation chronique des épithéliums biliaires favoriserait le développement de CC par l'accumulation de mutations au niveau de gènes associés à des tumeurs. De plus il semblerait que *p53* et *CDKN2A-2B* soient les cibles privilégiées de AID dans les cellules épithéliales gastro-intestinales (Komori et al., 2008).

1.1.2.5. Lymphomes T

Les premières preuves de l'implication de AID dans le développement de lymphomes T ont été apportées par l'analyse de souris transgéniques pour AID (Tg AID). Le développement d'un modèle de souris Tg AID, où AID est exprimée sous le contrôle du promoteur *Ick* spécifique des cellules T, a permis d'établir un lien entre l'expression de AID et le développement de lymphomes T (Rucci et al., 2006). D'autres modèles de souris Tg AID confortent cette observation. Les souris Tg AID dans lesquelles l'expression de AID est constitutive et ubiquitaire, sous le contrôle du promoteur de la β -actine du poulet, développent majoritairement des lymphomes T et, dans une moindre mesure, des microadénomes du poumon et des carcinomes hépatocellulaires, mais ne développent pas de lymphomes B (Kotani et al., 2005; Morisawa et al., 2008; Okazaki et al., 2003). Les lymphomes T présentent de nombreuses mutations au niveau des chaînes β du TCR, du CD4 et du CD5, ainsi qu'au niveau du gène suppresseur de tumeur *p53* des proto-oncogènes *c-myc* et *Pim1*,

mais aucune translocation n'a été observée (Kotani et al., 2005; Morisawa et al., 2008; Okazaki et al., 2003).

Les raisons pour lesquelles aucun lymphome B ne se développe dans ces souris restent inconnues, mais on peut penser que l'expression de AID étant physiologique dans les LB, des mécanismes de surveillance protègent les LB contre l'activité aberrante de AID. Confortant cette hypothèse, aucun lymphome B ne se développe chez des souris Tg AID dans lesquelles AID est exprimée uniquement dans les cellules B. De plus, malgré le haut niveau d'expression de AID, l'enzyme est incapable d'induire la SHM ou la CSR suggérant que des mécanismes protègent la cellule B de l'accumulation de mutations dans ces souris (Muto et al., 2006).

Le rôle de AID dans le développement des carcinomes épithéliaux associés à des maladies inflammatoires chroniques ainsi que les preuves récentes de l'implication de AID dans le développement de lymphomes T chez la souris, a poussé le groupe de Mori à étudier l'implication potentielle de AID dans le développement de l'ATL. L'Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATL) est une pathologie maligne très agressive au mauvais pronostic qui se développe dans un contexte d'infection par HTLV-1. Les cellules ATL accumulent un grand nombre de mutations et d'altérations chromosomiques (additions, délétions, translocations). Les mécanismes qui induisent cette grande instabilité génétique restent mal connus. La présence des transcrits de AID a été détectée dans des lignées cellulaires T HTLV-1 positives ainsi que chez quelques patients atteints d'ATL (Ishikawa et al., 2011). Les auteurs démontrent aussi que la protéine virale Tax est capable d'induire l'activation du gène *aicda* via les voies NF- κ B et CREB. La persistance de AID dans les cellules ATL alors que Tax n'est plus exprimé peut s'expliquer par le fait que la voie NF- κ B reste constitutivement activée dans les cellules ATL. Cependant le rôle de AID dans le développement de l'ATL reste à démontrer.

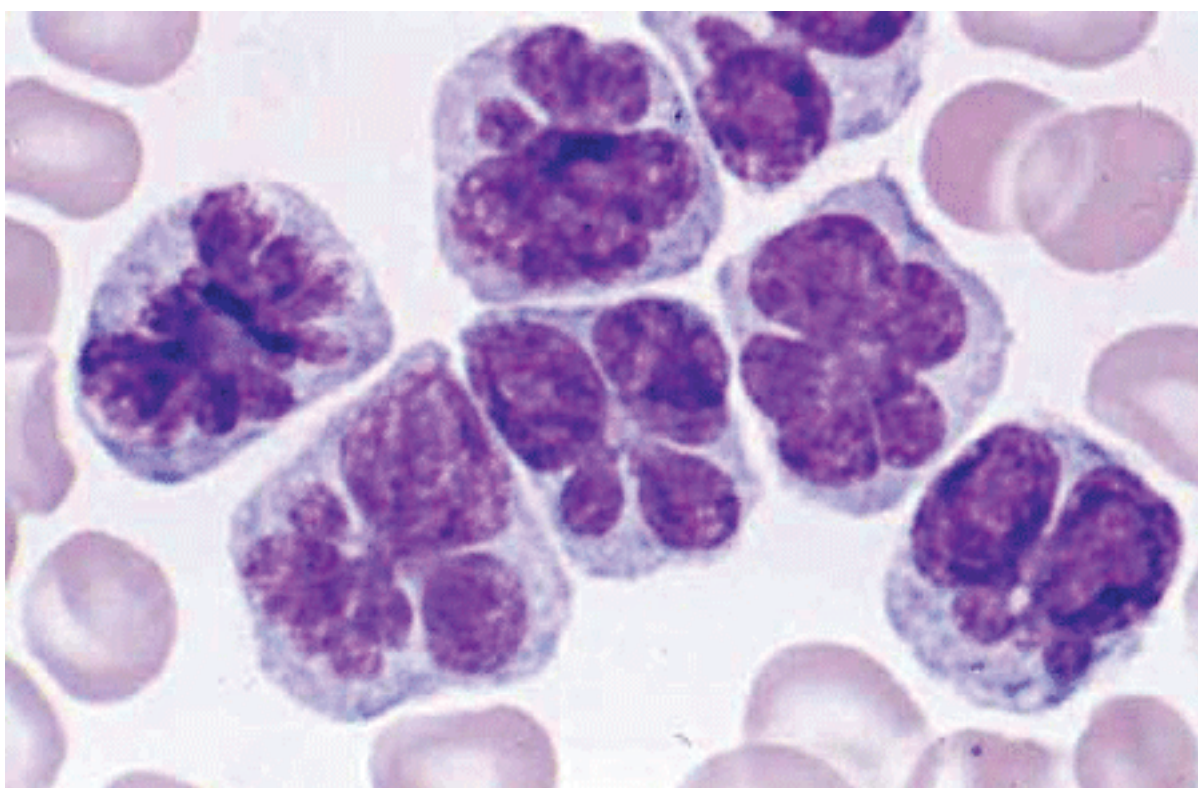


Figure 10 : Cellules d'ATL en forme de « flower cells ». Lymphocytes du sang périphérique présentant le phénotype plurilobé caractéristique des cellules infectées. Les cellules ont été observées après coloration de Leishman au grossissement x200.

2. HTLV-1 une bombe à retardement

Les cancers sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. Or, on sait aujourd'hui que certains facteurs génétiques et environnementaux, tels que le tabac, l'alcool, les produits chimiques, les radiations sont à l'origine de nombreux cancers. Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, une inflammation chronique ou une infection par une bactérie ou un virus fournissent aussi un terrain propice au développement de cancers.

Il est aujourd'hui établi que 15 à 20% des cancers ont une origine virale. La première preuve de cette relation entre virus et cancer a été faite par la découverte du premier virus oncogène, le virus Epstein-Barr en 1964, qui doit son nom à Epstein et Barr qui l'ont isolé en étudiant des biopsies de tumeurs semblables à celles observées 8 ans plus tôt en 1958 par D. Burkitt qui donna son nom au lymphome engendré par cette infection.

Par la suite d'autres virus ont été découverts comme agents étiologiques de cancers, les virus de l'hépatite B et C (HBV/HCV) responsables notamment de carcinomes hépatocellulaires, l'herpès virus humain de type 8 (HHV-8) responsable du sarcome de Kaposi, le papillomavirus (HPV) provoquant le cancer du col de l'utérus et HTLV-1 responsable du développement de la leucémie lymphoïde T de l'adulte (ATL).

HTLV-1 est le premier rétrovirus oncogène humain découvert. En 1979 l'équipe du Dr Gallo isole pour la première fois le virus HTLV-1 à partir d'une lignée cellulaire, HUT102, établie par Minna & Gazdar à partir d'un lymphome T cutané d'un patient (Poiesz et al., 1981). Quelques années auparavant Uchiyama et al., décrivent un sous-type de lymphome à cellules T qu'ils appelleront ATL, pour leucémie T de l'adulte, avec un phénotype particulier de noyaux plurilobés en forme de fleurs (flower cells). En co-cultivant des cellules leucémiques de patients ATL avec des cellules saines de sang de cordon ils ont pu établir une lignée cellulaire qu'ils ont appelé MT-2. En 1980 Yoshida et al., identifient un rétrovirus dans la lignée MT-2 ainsi que dans la lignée

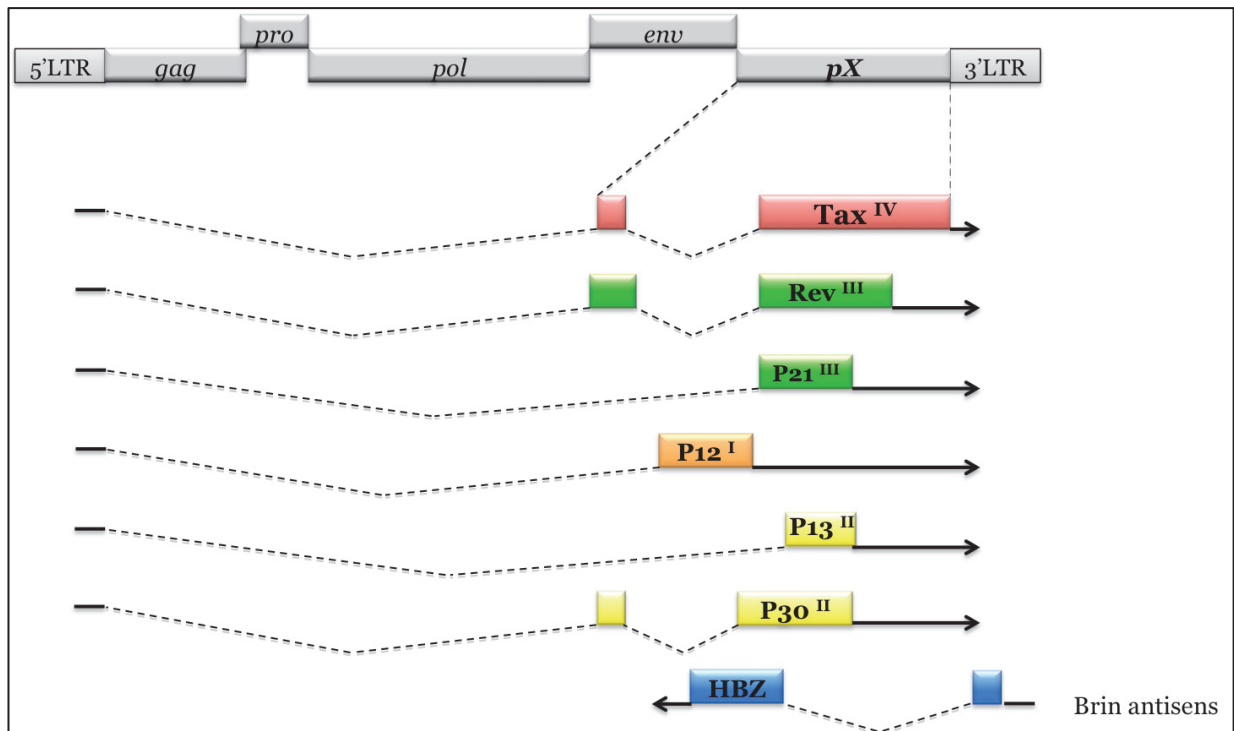


Figure 11 : Schéma de l'organisation génomique de HTLV-1 et de ses transcripts. Le provirus est flanqué en 5' et 3' par des séquences LTR (Long Terminal Repeat) contenant les séquences promotrices de la transcription du brin sens et anti-sens. Le génome contient les gènes spécifiques des rétrovirus *gag*, *pro*, *pol* et *env*. *gag*, *pro* et *pol* sont transcrits en un seul ARN qui subira des épissages alternatifs afin de donner trois ARNs. En 3' se trouve la région *pX* qui code pour les protéines régulatrices et accessoires telles que Tax et Rex ainsi que le gène anti-sens codant pour HBZ. Les différentes ORF sont indiquées en chiffres romains.

MT-1 dérivée de cellules leucémiques ATL (Yoshida et al., 1982). Ignorant que ce rétrovirus était le même que celui observé par l'équipe du Dr Gallo, ce virus fut nommé virus de l'ATL (ATLV). Ce n'est qu'en 1984 que le séquençage de l'ATLV révéla qu'il s'agissait en fait du virus HTLV-1 décrit par le Dr Gallo. La preuve est faite que HTLV-1 est un rétrovirus oncogène responsable du développement de l'ATL.

2.1. Généralités

Le virus HTLV-1 appartient à la famille des *retroviridae* et au genre des *deltaretrovirus*. Le virion HTLV-1 d'un diamètre d'environ 80 à 110 nm est constitué de deux molécules d'ARN sb positif d'environ 9kb associées à des molécules de la nucléocapside (p15). Le génome ainsi que les protéines virales (reverse-transcriptase et intégrase) sont contenus dans une capsidée constituée par la protéine p24. Le tout est protégé par une enveloppe composée de la membrane plasmique issue de la cellule hôte lors du bourgeonnement et de protéines virales (Matrice/p19, gp46 et gp21). Comme pour les autres rétrovirus, le génome de HTLV-1 est constitué des quatre gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* qui codent pour des protéines structurales et des enzymes indispensables à l'intégrité du virion (Figure 11). Le gène *gag* code pour un précurseur, pr53, qui après clivage donnera les protéines p15, p19 et p24. Le gène *pol* code pour la reverse transcriptase et l'intégrase et le gène *env* pour les protéines membranaires gp21 et gp 46.

HTLV-1 est considéré comme un rétrovirus complexe puisqu'en plus de ces quatre gènes communs à tous les rétrovirus il possède une région pX en 3' qui code pour sept protéines régulatrices et auxiliaire (Figure 11). La région pX possède quatre ORF dont une ORF anti-sens. Parmi les protéines codées par la région pX on retrouve les protéines Tax et Rex qui sont indispensables à la multiplication du virus, les protéines auxiliaires p12, p13, p21 et p30 impliquées dans la persistance virale en influant notamment sur la prolifération et la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire.

L'ORF anti-sens code pour la protéine HTLV-1 Basic Leucine Zipper (HBZ) qui est impliquée dans le maintien du phénotype tumoral et la prolifération de la cellule infectée.

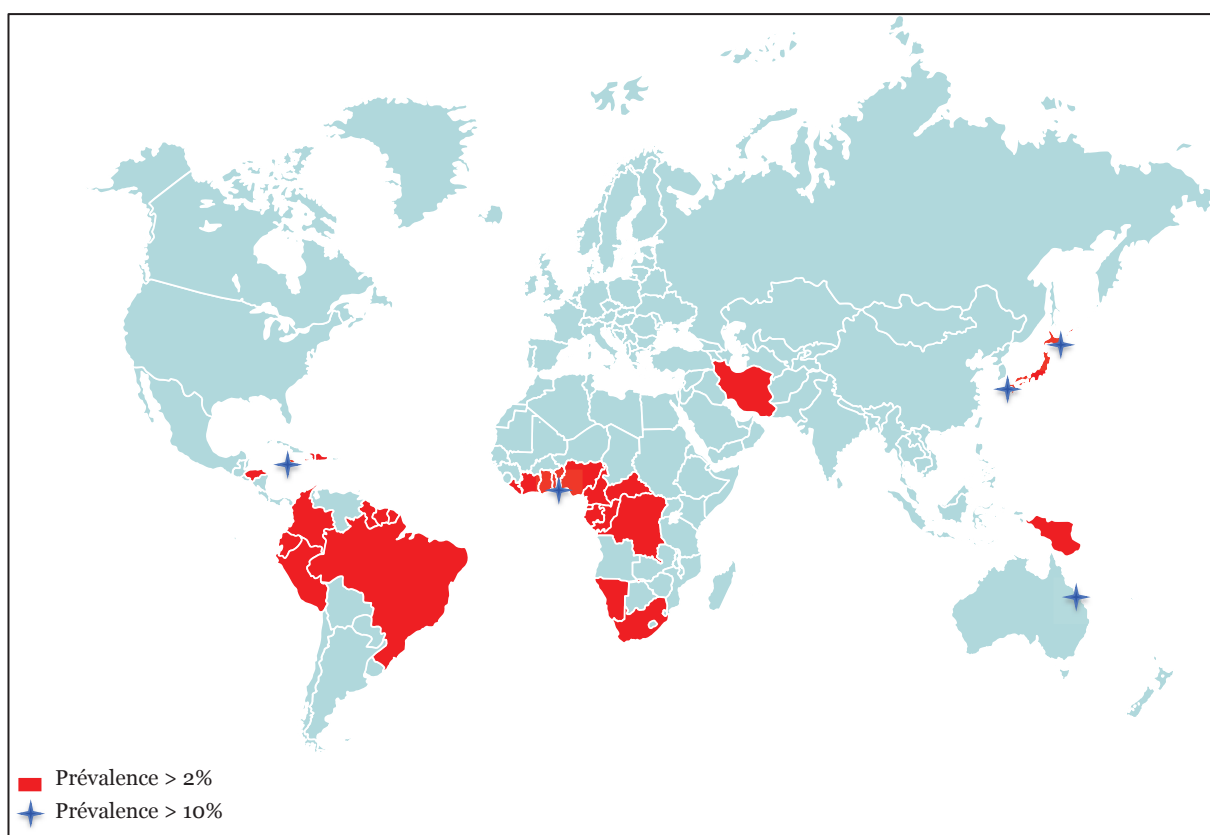


Figure 12 : Prévalence de HTLV-1 dans le monde. L'estimation de la prévalence est basée sur l'analyse sérologique de femmes enceintes et de donneurs sanguin. Il est à noter que les zones endémiques de HTLV-1 ne correspondent pas exactement aux frontières des pays représentées sur la carte. Pour exemple, au Japon et au Brésil, HTLV-1 est présent sous forme de foyers endémiques restreints à certaines régions du pays. Certains de ces foyers dont la prévalence dépasse 10% sont représentés par une étoile bleue.

De part et d'autre du génome de HTLV-1 on retrouve de longues séquences répétées, appelées LTR (Long Terminal Repeat), encadrées par des régions U5 en 5' et U3 en 3'. Ces LTR sont les promoteurs du génome viral, le LTR5' servant de promoteur aux gènes du brin sens et le LTR3' au seul gène du brin anti-sens, HBZ (Figure 11).

Tout comme HIV-1, HTLV-1 a un tropisme très marqué pour les lymphocytes T CD4⁺ mais infecte également les lymphocytes T CD8⁺, qui sont tous les deux les cellules à l'origine des pathologies associées à HTLV-1 (ATL et la Parapésie Spastique Tropicale/ Myélopathie Associée a HTLV-1 ; TSP/HAM). Malgré un tropisme marqué pour les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, de nombreuses études *in vitro* ont démontré que le virus HTLV-1 libre était faiblement infectieux pour ces cellules, suggérant que le virus devait en premier lieu infecter d'autres cellules avant de se propager aux cellules T. C'est en 2008 que Jones *et al.* démontrent que les cellules dendritiques immatures et les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont efficacement infectées par du virus HTLV-1 libre et sont capables de transmettre le virus à des lymphocytes CD4⁺ autologues (Jones et al., 2008).

2.2. Epidémiologie : HTLV-1 et potentiel oncogénique

Comme pour l'émergence du virus HIV, HTLV-1 a été transmis du singe à l'homme, mais semble-t-il, il y aurait plus de 2000 ans, des momies porteuses de HTLV-1 datant de cette période ayant été retrouvées au Chili.

Aujourd'hui HTLV-1 est réparti sous forme de foyers endémiques au Japon, dans les caraïbes, en Afrique centrale, dans certaines régions d'Amérique du sud et d'Amérique centrale, au Moyen Orient et en Australie (Gessain and Cassar, 2012; Proietti et al., 2005) (Figure 12). Les études accumulées depuis le début des années 80 montrent que le Japon est l'une des zones géographiques les plus touchées par le virus HTLV-1. En effet la prévalence de HTLV-1 au Japon varie de 0 à 37% en fonction des aires géographiques alors qu'elle est inférieure à 1% aux Etats-Unis et en Europe avec une plus forte représentation dans les populations immigrées (Gonçalves et al., 2010). A l'instar de HIV-1, HTLV-1 se transmet par voies sexuelles, par voies sanguines ainsi que par l'allaitement (Proietti et al., 2005), mais le nombre de personnes infectées est inférieure puisqu'on estime à 5-20 millions le nombre de

Pathologies	Association de l'infection par HTLV-1
--------------------	--

Pathologies cancéreuses

ATL	+++
Lymphome T cutané	+

Pathologies inflammatoires

TSP/HAM	+++
Uvéite	++
Dermatite	++
Syndrome de Sjögren	+
Arthrite	++
Polymyosite	+
Thyroïdite	+
Pneumopathie	+
Alvéolite lymphocytaire T	+

Complications infectieuses

<i>Strongyloides stercoralis</i>	+++
Tuberculose	++
Lèpre	++
Gale	+

Tableau 2 : Pathologies associées à l'infection par HTLV-1. L'association des différentes pathologies citées à l'infection par HTLV-1 a été déterminée d'après différentes études menées sur des cohortes de patients. +++ : association confirmée, ++ : association possible, + : cas rapporté. D'après Verdonck et al., 2007)

personnes infectées par HTLV-1 (Gessain and Cassar, 2012; de Thé and Bomford, 1993) contre plus de 35 millions pour HIV. Ces chiffres sont basés sur des dépistages sérologiques chez des donneurs de sang, des femmes enceintes et des patients hospitalisés. Le fait que les donneurs de sang soient principalement des hommes, souvent payés pour cela et que de nombreux foyers pandémiques sont localisés dans des régions du monde où la médecine n'est pas accessible à tous, il est raisonnable de penser que ces chiffres sont largement sous-estimés.

La grande majorité des personnes infectées par HTLV-1 reste asymptomatique puisque seulement 5 à 10% des personnes vont développer une pathologie. Les deux pathologies majeures associées à une infection par HTLV-1 sont l'ATLL et la TSP/HAM. D'autres pathologies semblent associées à l'infection par HTLV-1, parmi lesquelles l'uvéite (atteinte oculaire), syndrome de Sjogren, dermatites, arthropathies et complications respiratoires (Verdonck et al., 2007).

2.2.1. TSP/HAM

La TSP/HAM est une pathologie inflammatoire neurodégénérative qui touche le système nerveux central. Elle se déclare à l'âge adulte, aux alentours de 40-50 ans, chez environ 3% des personnes infectées, avec une prédominance féminine (Orland et al., 2003). La TSP/HAM est principalement associée à une transmission horizontale, transfusion sanguine ou relations sexuelles. La TSP/HAM est caractérisée par une évolution lente et progressive. La pathologie débute par des lombalgies, des troubles moteurs, douleurs dans les articulations et les membres inférieurs ainsi que des troubles au niveau des sphincters (Gessain and Mahieux, 2012). Malgré ces critères définis par l'Organisation Mondiale de la Santé il reste difficile de différencier la TSP/HAM d'une autre myélopathie. La façon la plus sûre de diagnostiquer la TSP/HAM est de détecter les anticorps anti-HTLV-1 dans le sang ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien.

D'un point de vue histologique la TSP/HAM se caractérise par une infiltration de cellules T activées CD4⁺ et CD8⁺ infectées par HTLV-1 dans le système nerveux central au début de la maladie puis essentiellement des T CD8⁺ par la suite (Umehara et al., 1993). Cette infiltration est accompagnée par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et de l'IFN- γ .

L'inflammation chronique du système nerveux central est associée à une démyélinisation et à une dégénérescence des axones. On observe chez les patients atteints de TSP/HAM une augmentation de la charge provirale par rapport aux sujets asymptomatiques, ainsi que la présence de cellules T CD8 cytotoxiques (CTL) spécifiques de HTLV-1 (Kannagi et al., 2011).

Les mécanismes conduisant au développement de la TSP/HAM restent inconnus cependant, partant des données histologiques, plusieurs modèles ont été proposés.

Le premier suggérant le rôle de la réponse CTL. En effet les LT CD8+ dirigés contre HTLV-1 pourraient attaquer les cellules infectées du système nerveux. Le second modèle proposé avance l'hypothèse que la dégénérescence nerveuse soit le résultat de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires neurotoxiques, comme le TNF- α . Enfin le dernier modèle pencherait pour la piste auto-immune. Cette auto-immunité serait due soit à l'infection par HTLV-1 de cellules T auto-réactives soit à la production d'Ac dirigés contre des épitopes de HTLV-1 partageant une forte homologie avec des épitopes du soi. C'est le cas de certains Ac dirigés contre Tax qui sont également capables de reconnaître une protéine du système nerveux central, la protéine hnRNP-A1 (heterogeneous nuclear ribonuclear protein A1).

La dégénérescence du système nerveux central est irréversible et à l'heure actuelle il n'existe aucun traitement efficace contre la TSP/HAM. Le développement de stratégies permettant de contrôler la charge provirale de HTLV-1 reste à ce jour le meilleur moyen de prévenir l'apparition de la maladie.

2.2.2. L'ATL

L'ATL est une forme rare et agressive de leucémie/lymphome T caractérisée par une lymphoprolifération maligne de cellules T CD4+ matures infectées par HTLV-1. Ces cellules présentent un noyau plurilobé, une chromatine condensée et un cytoplasme agranulaire et basophile (Figure 10 ; (Tsukasaki et al., 2009)). Des études ont démontré que les cellules ATL avaient une origine Treg/Th2 dont plus de la moitié expriment les marqueurs CD3, CD4, CD25, CCR4 et FoxP3 (Ishida et al., 2003; Kohno et al., 2005).

L'ATL se déclare généralement après une longue période de latence d'environ 30-50 ans après l'infection. Les cas d'ATL chez l'enfant sont extrêmement rares, seuls 25 cas ont été rapportés à ce jour (Bittencourt et al., 2006). Le risque de développer une ATL pour un patient séropositif est de 2,1% chez les femmes et 6,6% chez les hommes (Matutes, 2007). Les personnes développant une ATL sont très majoritairement des personnes infectées dès leur plus jeune âge, le plus souvent lors d'une transmission de la mère à l'enfant par l'allaitement (Goncalves et al., 2010). A la naissance le système immunitaire du nouveau-né est immature et lutte donc moins efficacement contre les pathogènes, ce qui permettrait une meilleure infection par HTLV-1. De plus l'infection à l'âge néo-natal plutôt qu'à l'âge adulte augmenterait les chances d'accumuler des mutations à l'origine de l'ATL.

Le processus de développement de l'ATL est long et les mécanismes précis concourant à l'apparition de clones ATL restent inconnus. Cependant d'après les connaissances actuelles nous pouvons proposer un modèle présenté dans la figure 13. Lors de la contamination par HTLV-1, le virus infecterait préférentiellement les cellules dendritiques (DC) plasmacytoïdes qui sont parmi les premières cellules présentes sur le site de l'infection (Colisson et al., 2010; Jones et al., 2008). Les DCs étant des cellules présentatrices de l'Ag, elles vont dans les organes lymphoïdes secondaires transmettre le virus aux lymphocytes. Le virion de HTLV-1 étant faiblement infectieux, le virus va se transmettre de cellules en cellules par contact et formation de synapses virales entre une cellule infectée et une cellule saine. Sous l'impulsion notamment de Tax, les cellules infectées vont proliférer massivement de manière polyclonale. Tax étant hautement immunogène, les cellules l'exprimant fortement vont être éliminées par la réponse CTL (Hanon et al., 2000). Afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire, des protéines virales telles que HBZ et p30 vont réprimer l'expression du génome viral et ainsi baisser le niveau d'expression de Tax. p30 va séquestrer les ARNm de Tax dans le noyau empêchant la traduction en protéine. HBZ quant à elle va entrer en compétition avec Tax dans le recrutement des facteurs CBP/p300 au niveau de la région 5'LTR. Ces événements participant à l'inhibition de l'expression de Tax vont permettre aux cellules de continuer à proliférer. Les cellules infectées vont ainsi pouvoir accumuler des anomalies génétiques et épigénétiques favorisant l'apparition de clones ATL. Le développement de l'ATL se fait par prolifération mono ou oligoclonale de clones malins.

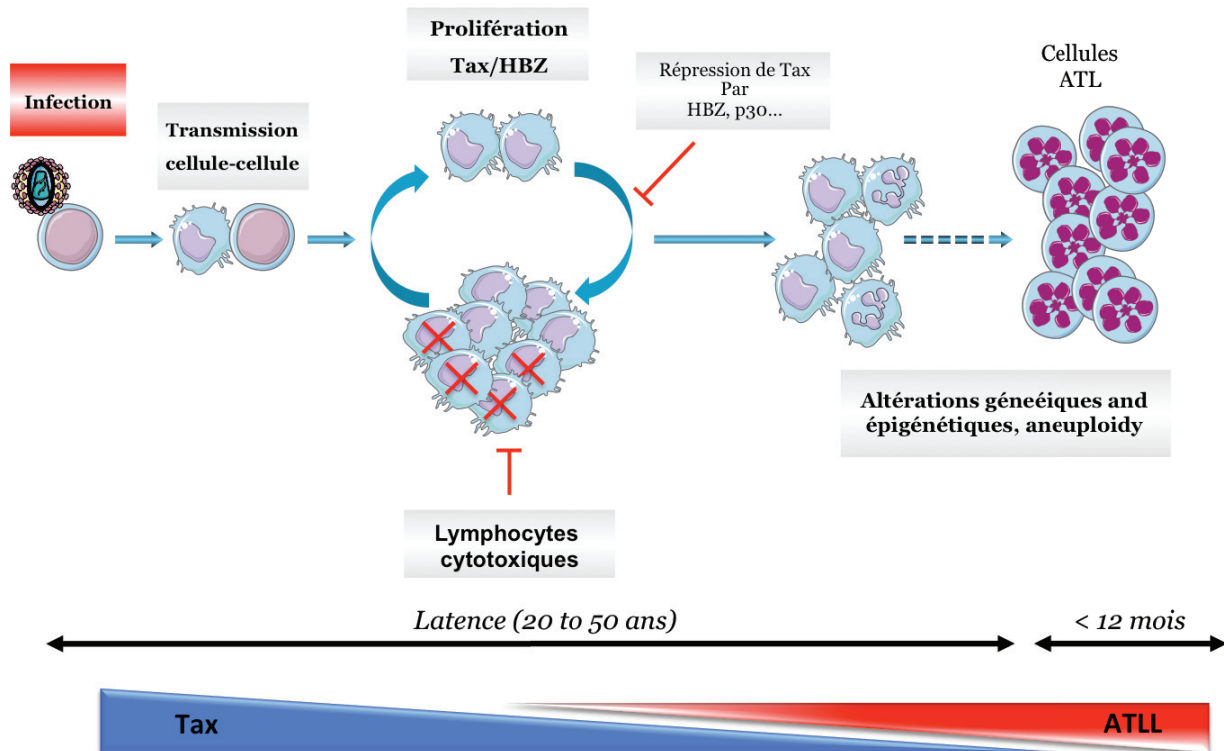


Figure 13 : Modèle du développement de l'ATL. Après l'infection de quelques cellules, le virus sera transmis de cellules en cellules par le biais de synapses virales. Les cellules infectées vont ainsi proliférer de manière polyclonale. La protéine virale Tax est très fortement exprimée et va moduler un grand nombre de voies cellulaires menant entre autre à une instabilité génomique. Les lésions créées ainsi que le fait que la protéine Tax soit hautement immunogène vont conduire à l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire maîtrisant la prolifération. La protéine HBZ en entrant en compétition avec Tax ou encore p30 qui séquestre l'ARNm de Tax vont inhiber l'expression du génome viral diminuant la quantité de Tax dans les cellules et par la même l'immunogénicité des cellules. Cet événement pourrait être à l'origine de l'échappement au système immunitaire de certaines cellules infectées exprimant plus faiblement Tax. Ces cellules vont pouvoir accumuler des mutations et anomalies génomiques conduisant. L'accumulation de ces anomalies peut favoriser l'émergence de clones malins d'ATL.

D'un point de vue génétique il semblerait que certains haplotypes de HLA (Human Leucocyte Antigen), A26, B4002, B4006 et B 4801 prédisposent les patients au développement d'ATL (Yashiki et al., 2001). En effet une étude menée au japon révèle que la fréquence de ces haplotypes est significativement plus élevée chez les patients atteints d'ATL que chez les patients atteints de TSP/HAM ou asyptomatiques. Il semblerait que les CD8 de ces patients soient incapables de présenter des épitopes de Tax par présentation croisée (Yashiki et al., 2001).

En 2008, l'Organisation Mondiale de la santé a subdivisé l'ATL en 4 sous-groupes en accord avec la classification de Shimoyama (Shimoyama, 1991) (Ohshima et al. 2008), 1) le type aigu (60%) caractérisé par une hyperleucocytose avec des lymphocytes atypiques et une eosinophilie, une lymphadénopathie, une organomégalie, des lésions cutanées et une hypercalcémie présente chez plus de 70% des patients, provoquant des dysfonctionnements rénaux et problèmes neuropsychiatriques; 2) le type lymphomateux (20%) avec une lymphadénopathie marquée sans leucémie (<1% de cellules T anormales); 3) le type chronique (15%) caractérisé par des rashes, une lymphocytose T, une lymphadénopathie modérée et une hypercalcémie et 4) le type indolent (5%), avec une numération normale et moins de 5% de cellules T anormales circulant dans le sang. Les formes chroniques et indolentes peuvent spontanément évoluer en forme aiguë.

En l'absence de traitement la médiane de survie est de 2 ans pour les formes indolentes et chroniques, de 10 mois pour la forme lymphomateuse et de seulement 6 mois pour la forme aiguë (Jabbour et al., 2010). Les formes indolentes et chroniques ne sont généralement pas traitées du fait de l'âge souvent trop avancé des patients qui présentent d'autres maladies systémiques.

A l'heure actuelle aucun traitement ne permet une rémission totale et ce quelque soit la forme d'ATL. Le traitement combinant zidovudine (AZT) et l'interféron- α est celui fournissant les meilleurs résultats surtout sur les formes indolentes et chroniques puisqu'on observe un taux de réponse allant de 65% à 92% et de rémission de près de 50% (Bazarbachi et al., 2010; Hermine et al., 2002; Matutes et al., 2001). En revanche pour la forme aiguë ce traitement semble relativement inefficace bien que la médiane de survie soit prolongée à 4 ans dans plus de 50% des cas (Matutes et al., 2001). La forme indolente quant à elle ne répond pas à ce genre de traitement. Des traitements basés sur une combinaison de drogues

chimiothérapeutiques (adriamycine, cyclophosphamide, vincristine, prednisone) et/ou une greffe allogénique de cellules souches sont les thérapies les plus courantes, notamment au Japon, et donnent de très bons résultats préliminaires sur les formes aiguës et lymphomateuses puisqu'environ 35% des patients voient leur médiane de survie portée à 82 mois (Choi et al., 2011).

2.3. Tax : Une protéine au cœur du processus leucémogène.

La protéine Tax ou p40, d'après son poids moléculaire de 40kDa, est l'une des toutes premières protéines exprimées par le provirus de HTLV-1. L'un des rôles majeurs de Tax est d'assurer la transcription du génome viral au niveau du 5'LTR (Felber et al., 1985). Le 5'LTR comporte 3 domaines conservés de répétition de 21 paires de bases appelées TxRE (Tax Responsive Element) composées de séquences vCRE (Viral Cyclic AMP Response Element) reconnues par CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), le facteur de transcription principal du promoteur viral. Au niveau de ces régions Tax va interagir et recruter les facteurs CREB (Baranger et al., 1995; Jeang et al., 1988), CBP/p300 (CREB Binding Protein) (Harrod et al., 2000), pCAF (Okada and Jeang, 2002) et les facteurs de la famille TFII (Clemens et al., 1996; Lu et al., 2002). Tax s'associe au domaine bZIP de CREB et i) facilite son recrutement au niveau des séquences vCRE ii) facilite sa dimérisation et iii) stabilise l'interaction avec le promoteur (Grassmann et al., 2005; Kashanchi and Brady, 2005). L'association du complexe Tax/CREB sur le 5'LTR permet alors le recrutement de l'hétérodimère CBP/p300 qui, de part l'activité acétyltransférase de ces deux protéines, permet l'acétylation de l'ADN au niveau des nucléosomes, induisant un changement de conformation de celui-ci. Ceci va permettre le recrutement des facteurs TFII A et D ainsi que de l'ARN polymérase II (Ching et al., 2004) et ainsi la transcription des gènes codés par le brin positif.

Tax apparaît donc comme l'acteur majeur de la transcription du génome viral, à l'exception de la transcription de la protéine HBZ qui est codée par le brin négatif à partir du 3'LTR qui elle n'est pas sous le contrôle de Tax (Yoshida et al., 2008).

2.3.1. Tax une protéine oncogénique capable d'interagir avec un grand nombre de partenaires cellulaires.

En dehors de son action sur la transcription du génome viral, il est aujourd'hui admis que la protéine Tax est indispensable au développement de l'ATL.

En effet Tax, qui est localisée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, interagit avec un grand nombre de protéines cellulaires et module ainsi l'expression de nombreux gènes et diverses fonctions cellulaires (Boxus et al., 2008). En dérégulant des voies de signalisation majeures qui contrôlent les fonctions clefs de la cellule, comme le cycle cellulaire, ou les mécanismes qui contrôlent la survie et la mort cellulaire, ou encore la réparation de l'ADN, la protéine Tax est un acteur majeur du processus leucémogène des cellules infectées.

2.3.1.1. Tax une protéine au pouvoir oncogénique

La transformation tumorale se déroule généralement en deux étapes. L'immortalisation qui est la première étape, est caractérisée par un potentiel prolifératif illimité sous la dépendance de l'IL-2 ainsi que par l'expression du marqueur CD25. La transformation au sens strict est caractérisée par l'acquisition d'un phénotype tumoral et une croissance indépendante de l'IL-2.

L'oncoprotéine Tax joue un rôle majeur dans le processus de transformation tumoral associée à l'infection par HTLV-1. L'implication de Tax dans l'immortalisation et la transformation cellulaire a d'abord été démontrée dans des fibroblastes embryonnaires de souris et de rats. La simple transfection d'un provirus défectif permettant l'expression de Tax, a montré que l'expression de Tax est suffisante pour induire l'immortalisation in vitro de ces cellules sans changement de morphologie (Tanaka et al., 1990). De telles cellules injectées dans des souris immunodéficientes (Nude) forment des tumeurs démontrant ainsi le pouvoir transformant de Tax (Pozzatti et al., 1990; Tanaka et al., 1990).

La preuve que Tax est capable d'immortaliser des cellules T primaires a été apportée par l'utilisation d'un vecteur rhadinoviral dérivant de l'*Herpes saimiri* (Grassmann et al., 1989 ; Grassmann et al., 1992), ou d'un vecteur rétroviral (Akagi and Shimotohno, 1993) permettant l'expression de Tax. L'infection par ces vecteurs

de cellules T primaires induit leur immortalisation avec un phénotype très proche de celui des cellules T transformées par HTLV-1 (Akagi et al., 1995 ; Rosin et al., 1998 ; Schmitt et al., 1998).

La capacité de Tax à transformer des cellules *in vivo* a été démontré grâce à l'utilisation de souris transgéniques (Grossman et al., 1995; Hasegawa et al., 2006; Ohsugi et al., 2007). Le modèle de souris transgénique ciblant spécifiquement le compartiment des T matures en utilisant une construction de Tax sous le contrôle du promoteur du granzyme B, développe de larges lymphomes granulaires accompagnées de lésions ostéolytiques comparable à celles retrouvée chez les patients ATL (Grossman et al., 1995). Un autre modèle de souris transgéniques dans lesquelles l'expression de Tax est sous le contrôle du promoteur *lck*, développent des lymphomes diffus à larges cellules et des leucémies à environ 12 mois (Hasegawa et al., 2006). Ces travaux démontrent un rôle crucial de Tax dans l'immortalisation et la transformation cellulaire.

Comparativement aux fibroblastes embryonnaires de rongeurs, les cellules humaines sont relativement résistantes à la transformation par Tax seul (Hahn et al., 1999; Haller et al., 2006). De façon intéressante, l'activité transformante de Tax dans les cellules de rongeur est inhibée quand celles-ci sont fusionnées à des cellules humaines, suggérant la présence d'inhibiteurs de l'activité de Tax dans les cellules humaines (Inoue et al., 1994). Une meilleure compréhension des mécanismes de transformation cellulaire associés à HTLV-1 permettrait de mieux situer la place de Tax dans ce processus.

Le modèle de transformation proposé à ce jour fait intervenir Tax dans les l'initiation de la leucémogénèse. Tax qui est fortement exprimé dans les phases précoces de la leucémogénèse induit notamment l'immortalisation des cellules. La transformation serait ainsi assurée par la protéine HBZ qui est constitutivement exprimé dans les cellules infectées ainsi que dans les cellules ATL. Cependant, on peut aussi imaginer que Tax serait également responsable de la transformation. En effet, en induisant une instabilité génétique et en influant sur la survie et les voies de réparation de l'ADN (nous reviendrons sur ces points un peu plus loin), Tax induirait un environnement favorable à la transformation tumorale.

2.3.1.2. Activation et importance de la voie NF- κ B dans la transformation cellulaire induite par Tax.

Les facteurs de transcription NF- κ B existent sous forme d'homo- ou hétérodimères constitués des sous-unités p50, p52, p65 (RelA), RelB et c-Rel, l'hétérodimère p50 : p65 étant le plus abondant dans les cellules. Il existe deux voies NF- κ B distinctes : i) la voie classique mettant en jeu les sous-unités p50 et p65 est impliquée dans la régulation de l'inflammation et de l'apoptose ii) la voie alterne impliquant les sous-unités p52 et RelB joue un rôle dans l'organogenèse lymphoïde (Lo et al., 2006; Shembade, 2010). Seuls p65, RelB et c-Rel possèdent un domaine d'activation de la transcription, les protéines p50 et p52 ont donc la nécessité de s'associer à l'un de ces facteurs pour avoir une activité transcriptionnelle. Dans le cytoplasme, les facteurs NF- κ B sont associés à des inhibiteurs appelés I κ B α et I κ B β (Beg et al., 1992). En réponse à certains stimuli comme des cytokines proinflammatoires (TNF- α , GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8), le LPS ou un stress (Karin et al., 2002; Li and Verma, 2002; Pahl, 1999), I κ B α/β sont phosphorylées par une I κ B kinase (IKK) composé de 3 sous-unités IKK α , IKK β et IKK γ (NEMO ; (Jin et al., 1999; Yamamoto and Gaynor, 2004)), puis une ubiquitination conduit à leur dégradation par le protéasome (Karin and Ben-Neriah, 2000). La dégradation des sous-unités I κ B va permettre la translocation nucléaire des dimères NF- κ B ((Karin and Ben-Neriah, 2000) Figure 14). La sous-unité p65, qui est la sous-unité la plus abondante dans les cellules, ainsi libérée est phosphorylée par la PKA, phosphorylation indispensable à son activité transcriptionnelle (Zhong et al., 1997). Après phosphorylation, la sous-unité p65 est transloquée vers le noyau. Elle est alors capable de se lier, à l'instar de Tax, aux co-activateurs CBP/p300, ce qui semble essentiel à l'activité transcriptionnelle des dimères p65 : p65 et p50 : p65 (Sheppard et al., 1999).

Il est clairement établi aujourd'hui que Tax interagit avec les membres des voies NF- κ B conduisant à leur activation. L'activation de la voie NF- κ B joue un rôle primordiale dans la transformation, la prolifération et la survie des cellules infectées par HTLV-1 (Jeang, 2001; Karin et al., 2002; Ng et al., 2001; Sun and Yamaoka, 2005).

En effet, dans les années 90, des expériences ont démontré l'importance du rôle de NF- κ B dans la transformation cellulaire induite par Tax. Notamment, l'utilisation

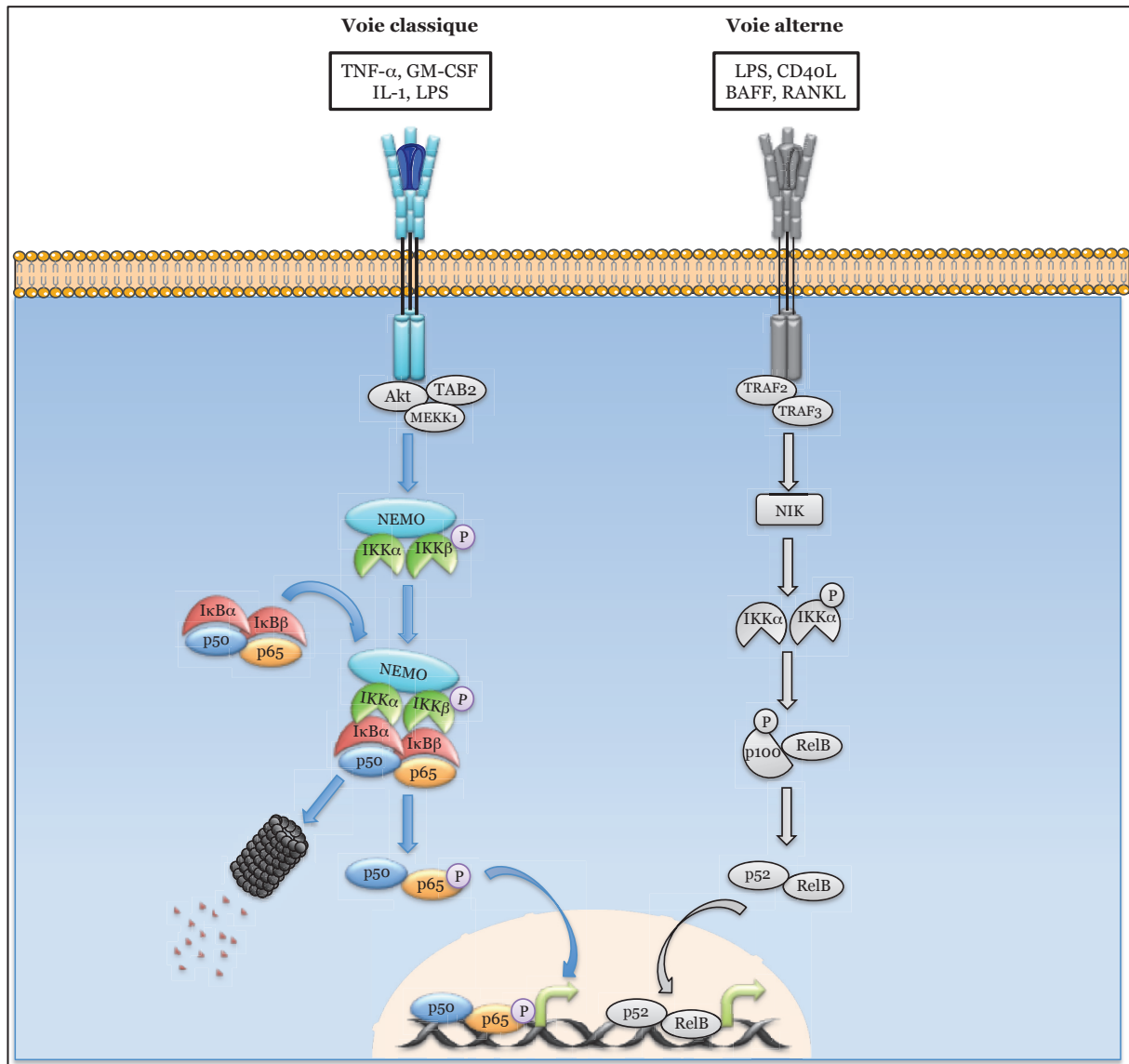


Figure 14 : Schéma de l'activation de la voie classique de NF- κ B. à l'état basal les facteurs de NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme par les inhibiteurs I κ B α et β . L'activation de récepteurs par des signaux comme le TNF- α , l'IL-1 ou le LPS va induire l'activation du complexe IKK α /IKK β /NEMO. Ce complexe va phosphoryler les inhibiteurs I κ B qui seront par la suite ubiquitinylés et dégradés par le protéasome 26S. L'élimination des I κ B va permettre la libération de la séquence NLS des facteurs NF- κ B et par la même leur translocation dans le noyau à la suite de la phosphorylation de p65. Les facteurs de NF- κ B vont ainsi pouvoir induire l'expression de gènes cibles.

de mutants de Tax défectifs pour la voie NF- κ B (TaxM22 et Tax410) sont incapables de transformer des fibroblastes de rats *in vitro* (Matsumoto et al., 1997). Afin de tester le rôle de Tax dans l'immortalisation de cellules primaires humaines, Robek et Ratner, ont introduit les mutations correspondantes à TaxM22 au niveau du gène de tax dans le clone moléculaire de HTLV-1, ACH. La transfection des particules virales ACH-TaxM22 inhibe la transformation des lymphocytes T primaires démontrant que la voie NF- κ B était indispensable pour l'immortalisation de cellules T humaines (Robek and Ratner, 1999).

Dans le cytoplasme Tax est capable de se lier aux différents activateurs et inhibiteurs de la voie NF- κ B, permettant ainsi son activation. En premier lieu Tax est capable d'activer les kinases MEKK1, Akt, TAB2, NRP (NEMO-Related Protein ; (Avesani et al., 2010; Jeang, 2001; Journo et al., 2009; Peloponese and Jeang, 2006)) responsables de la phosphorylation des IKKs. Il a été démontré que Tax pouvait aussi interagir avec les sous-unités du complexe IKK (NEMO, IKK α et IKK β) augmentant ainsi l'activité kinase du complexe IKK (Chu et al., 1998; Harhaj and Sun, 1999; Iha et al., 2003) ce qui conduit à la dégradation de I κ B α/β . Des études ont montré que Tax pouvait aussi lier directement aux I κ Bs et induire leur dégradation par le protéasome de manière indépendante à l'action du complexe IKK (Jin et al., 1999). Tax réprime également les inhibiteurs du complexe IKK tel que PP2A (Fu et al., 2003). Ainsi dans les cellules infectées par HTLV-1, les cellules transformées ainsi que les cellules ATL, la voie NF- κ B est constitutivement activée par Tax (Figure 15 ; (Hironaka et al., 2004; Mori et al., 1999; Portis et al., 2001; Yoshida, 2001)).

Dans le noyau, Bex et al. ont démontré que la protéine Tax était localisée dans des structures uniques contenant p50 et p65, l'ARN polymérase 2, le brin d'ARN en formation et des facteurs d'épissage (Bex et al., 1997), et qu'elle joue également un rôle important dans la régulation de l'activation de la voie NF- κ B.

Tout d'abord il a été démontré que Tax était capable d'induire l'expression de p50, p65, c-Rel et p52 (Arima et al., 1991). Tax se lie directement à p50, p65, c-Rel et p52 (Murakami et al., 1995; Suzuki et al., 1993, 1994) et favorise ainsi leur dimérisation, étape essentielle à leur liaison sur les NF- κ B responsive element au niveau des promoteurs des gènes cibles (Suzuki et al., 1993, 1994). Tax reste lié aux

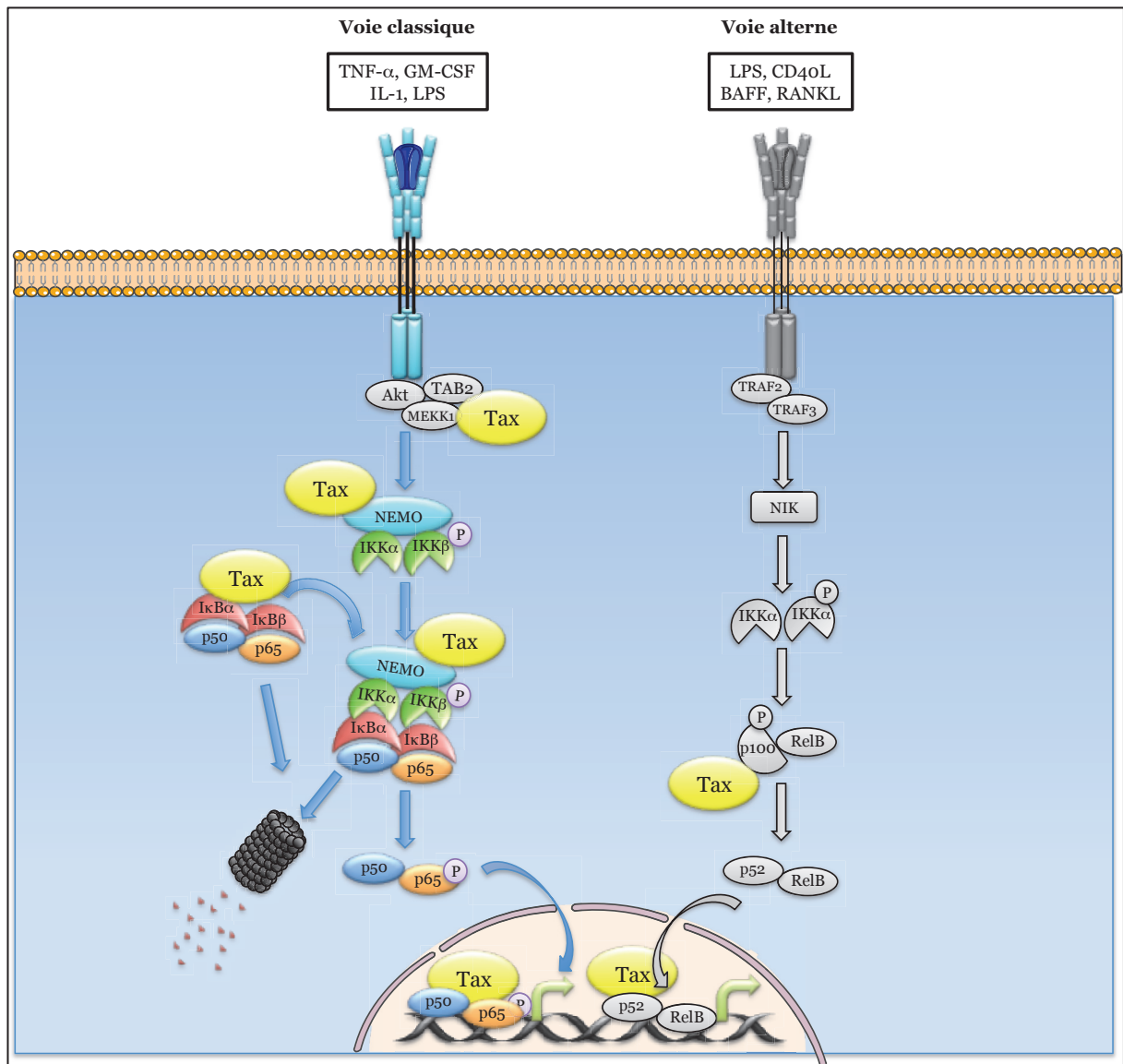


Figure 15 : Modulation de la voie NF-κB par la protéine virale Tax. Tax est capable d'induire l'activation de la voie NF-κB en agissant à différents niveaux de régulation de cette voie. Tax est capable de se lier aux protéines Akt, TAB2 ou MEKK1 et de les activer, ce qui permettra l'activation des IKKs. Tax est également capable de se lier et d'activer les IKK ou encore de se fixer directement sur les IκB et d'induire leur dégradation protéasomale. Dans le noyau Tax est capable de se fixer aux facteurs NF-κB et de les recruter au niveau des séquences des gènes cibles.

facteurs NF- κ B après fixation sur l'ADN et stimule leur activité transcriptionnelle (Suzuki et al., 1993, 1994). Tax va recruter les facteurs CBP/p300 (Bex et al., 1998; Vendel et al., 2003) et P/CAF (Jiang et al., 1999) qui sont les co-activateurs de NF- κ B et ainsi stimuler encore un peu plus son activité transcriptionnelle.

Tax est donc capable à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau d'induire l'expression et l'activation des membres de la famille NF- κ B indispensable à la transformation, la prolifération et la survie des cellules infectées.

2.3.1.3. Tax : prolifération des cellules T et perte du contrôle du cycle cellulaire

Une des caractéristiques principale de Tax, qui participe à son pouvoir oncogène, est sa capacité à promouvoir l'hyperprolifération des cellules infectées soit de manière directe en interagissant avec les acteurs du cycle cellulaire soit de manière indirecte en induisant la sécrétion de cytokines et/ou de récepteurs de cytokines. Cette hyperprolifération ainsi que la plus grande résistance des cellules infectées à la mort cellulaire, conduit à l'apparition d'un grand nombre d'altérations génomiques et à l'immortalisation des cellules T.

2.3.1.3.1. Modulation de l'expression de cytokines et/ou de leur récepteurs par Tax : conséquence sur la prolifération et la modulation de la réponse immunitaire.

La réalisation d'analyses de transcriptomes a mis en évidence la dérégulation de plus de 750 gènes dans des lignées cellulaires T établies à partir de PBL de patients ATL, et comparées à des lymphocytes de donneurs sains (Pise-Masison et al., 2002). Parmi ces gènes certains sont directement impliqués dans l'activation et la prolifération des cellules T, tels que les cytokines et leurs récepteurs.

Plusieurs études ont notamment démontré que Tax était capable d'induire l'expression du facteur de croissance des cellules T, l'interleukine 2 (IL-2) ainsi que la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (Ballard et al., 1988; Crenon et al., 1993;

Grassmann et al., 2005; Hoyos et al., 1989; Ruben et al., 1988), conduisant ainsi à une prolifération accrue des cellules infectées.

L'IL-21 et son récepteur IL-21R activent un certain nombre de voies intracellulaires nécessaires à la prolifération des cellules T en particulier des cellules ATL (Ueda et al., 2005). Récemment il a été montré que Tax induisait l'uprégulation à la fois de l'IL21 et de son récepteur dans les cellules T Jurkat (Mizuguchi et al., 2009).

D'autres cytokines et/ou récepteurs de cytokines sont fortement exprimés par les cellules infectées par HTLV-1 comme l'IL-15 (Azimi et al., 1998) et son récepteur (IL-15R ; (Mariner et al., 2001)), le GM-CSF (Himes et al., 1993) ou encore le TNF- α (Albrecht et al., 1992).

Ces différentes études suggèrent que la prolifération des cellules infectées ne dépend pas uniquement de l'IL2 mais d'une combinaison de plusieurs cytokines exprimées sous l'impulsion de Tax permettant la prolifération des cellules infectées par HTLV-1. L'expression de ces diverses cytokines et de leur récepteurs pourrait être à l'origine de la capacité des cellules infectées et des cellules transformées par HTLV-1 à proliférer en absence d'IL-2.

De plus une étude menée par Tomita et al. a mis en évidence que Tax induisait l'expression de miRNAs et en particulier de miR-146a qui favorise la prolifération des cellules infectées (Tomita et al., 2012). Cet effet a été confirmé en utilisant des anti-miR. Ainsi, en inhibant miR-146a, les auteurs observent une diminution de la prolifération des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, alors que la prolifération des lignées non-infectées n'est pas affectée (Tomita et al., 2009). L'expression de miR-146a semble être dépendante de l'activation de la voie NF- κ B.

2.3.1.3.2. Tax perturbe le cycle cellulaire en inhibant les protéines impliquées dans les points de contrôles.

Tax est également capable de favoriser la prolifération cellulaire en dérégulant les différentes étapes du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes supérieures comprend 4 phases : G1 (croissance cellulaire, préparation à la phase S),

S (Synthèse : doublement du matériel génétique à l'identique), G2 (préparation à la phase M), M (Mitose : séparation rigoureusement identique du matériel génétique). Un autre stade, hors du cycle cellulaire, le stade G₀ correspond à l'état de quiescence de la cellule, sans division. La progression des cellules dans les phases du cycle cellulaire est finement contrôlée. Chaque phase du cycle est régulée par un tandem de cycline- cyclines-dependent kinase (CDK) spécifique de la transition G₁/S, de la phase S et de la transition G₂/M (Figure 16).

Lors de la phase G₁, Tax va interagir directement avec la cycline D₁ et ainsi permettre l'accélération de cette phase (Kim et al., 2010). Tax est aussi capable de moduler les interactions entre les cyclines et les CDKs, ce qui a pour conséquence de modifier la spécificité de ces interactions (Santiago et al., 1999) et/ou de stabiliser leurs interactions, comme dans le cas du complexe cycline D/CDK4/6 (Haller et al., 2002; Neuveut et al., 1998; Schmitt et al., 1998; Yang et al., 2011).

Au cours de la transition G₁/S Tax induit, principalement via les facteurs de transcription CREB et NF-κB, une sur-expression des cyclines D₁ (Kim et al., 2010), D₂ (Akagi et al., 1996; Iwanaga et al., 2008; Santiago et al., 1999) et E, ainsi que des kinases CDK2, CDK3, CDK4 et CDK6 (Iwanaga et al., 2001, 2008; Neuveut and Jeang, 2002; Schmitt et al., 1998). Ces surexpressions que l'on retrouve dans les cellules infectées de patients, vont favoriser l'association des cyclines D₁ et D₂ avec d'autres partenaires que leur partenaires habituels (Santiago et al., 1999) et ainsi accélérer la phase G₁ et l'entrée en phase S.

Tax peut également réprimer l'expression et/ou la fonction d'inhibiteurs des CDKs tels que p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18, p19^{INK4d} (Akagi et al., 1996; Hannon and Beach, 1994; Iwanaga et al., 2001; Low et al., 1997; Suzuki et al., 1996, 1999).

Au contraire Tax induirait l'expression de p21^{cip/waf1} (Akagi et al., 1996; Iwanaga et al., 2001; de La Fuente et al., 2000; Liu et al., 2008b; Tripp et al., 2005).

L'effet de Tax sur la régulation de p27^{kip1} reste sujet à controverse. En effet certaines études démontrent une diminution de l'expression de p27^{kip1} par Tax (Iwanaga et al., 2001) alors que d'autres montrent qu'à l'instar de p21^{cip/waf1} l'expression de p27^{kip1} est augmentée dans les cellules infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax (Iwanaga et al., 2001 ; Tripp et al., 2005 ; Liu et al., 2008).

Tax peut également accélérer la phase G1 en induisant l'expression du facteur de transcription E2F qui est normalement séquestré sous forme inactive par la protéine du Rétinoblastome (pRb). Sous l'action de Tax, (notamment en inhibant p15INK4B

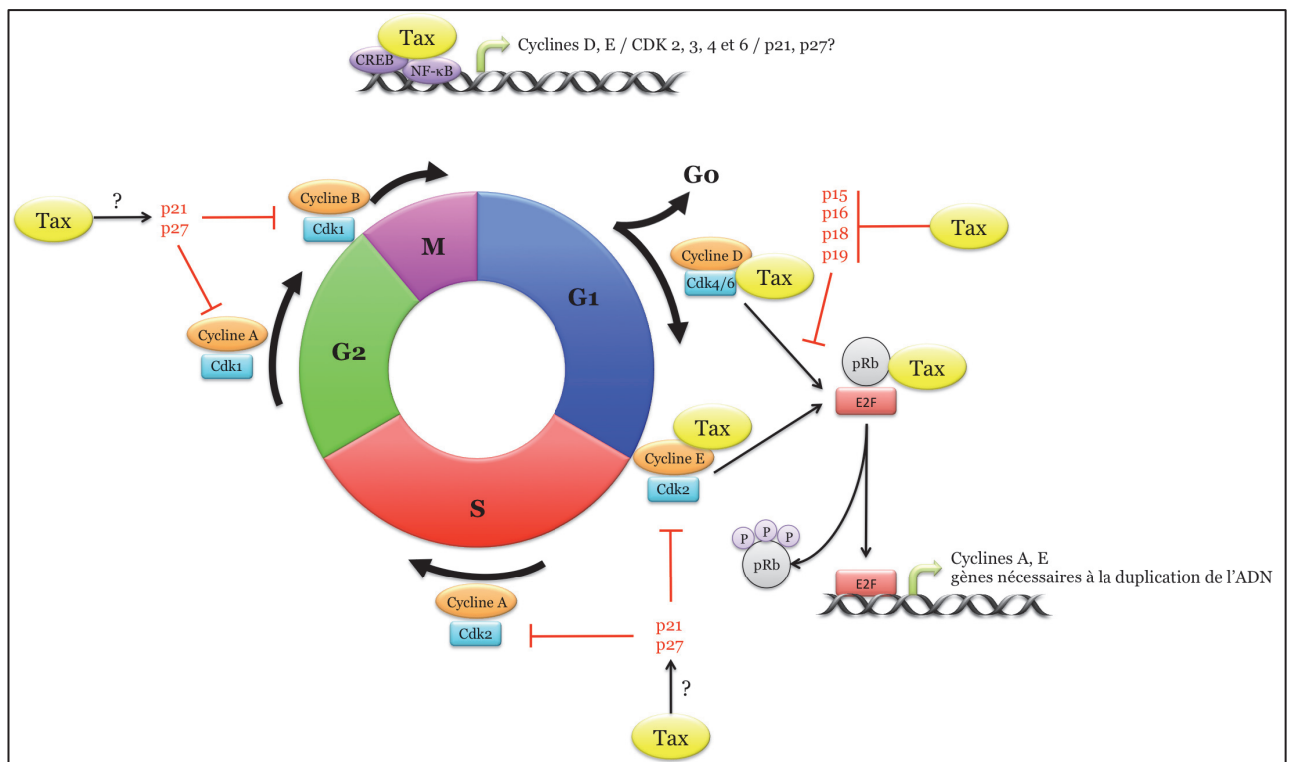


Figure 16 : Modulation du cycle cellulaire par Tax. Tax favorise la progression du cycle cellulaire en agissant sur l'expression et l'activation de facteurs régulant le cycle cellulaire. Tax active la transcription des gènes des Cyclines D et E, des CDK2, 3, 4 et 6 et réprime l'expression d'inhibiteurs des CDKs favorisant l'association entre cyclines et CDK. Tax est aussi capable d'interagir avec des cyclines favorisant et stabilisant leur interaction avec des CDK. Tax va également induire la dégradation du facteur pRb et ainsi libérer le facteur de transcription E2F qui va induire l'expression de gènes nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire et à la duplication de l'ADN.

et p16INK4A et en favorisant la formation de complexe Cycline D/CDK4/6) pRb va être phosphorylée et dégradée (Iwanaga et al., 2001; Ohtani et al., 2000) ce qui libèrera E2F qui va pouvoir induire l'expression de nombreux gènes indispensables à la transition G1/S dont Cycline A, Cycline E et des gènes nécessaires à la duplication de l'ADN.

La protéine Tax est donc capable d'accélérer la phase G1 et de favoriser l'entrée en phase S en induisant l'expression des protéines constitutantes des complexes Cyclines/CDKs et en diminuant l'expression des inhibiteurs des complexes Cyclines/CDKs. De plus, en induisant l'expression et l'activation du facteur E2F et du complexe Cycline B/Cdk1, Tax va perturber et accélérer la phase S ainsi que l'entrée en mitose.

L'induction de l'expression de certains inhibiteurs tels que p21 et p27 semble contradictoire avec le modèle proposé d'accélération du cycle cellulaire par Tax. De plus dans une étude publiée en 2008, Liu et al., ont montré que des cellules HeLa ou SupT1 infectées par HTLV-1 ou transduites avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax, subissaient un arrêt en phase G0/G1 (Liu et al., 2008). Ces mêmes résultats ont été observés dans des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ exprimant Tax (Tripp et al., 2005) ou infectés par HTLV-1 (Banerjee et al., 2008). Dans tous les types cellulaires étudiés l'arrêt en G0/G1 est associé une up-régulation de l'expression de p21 et p27. Dans l'étude menée par Liu et al., seules les cellules HOS infectées ou exprimant Tax ont une division cellulaire normale (Liu et al., 2008). De manière intéressante, on observe dans ces cellules une absence d'expression de p21 et p27. L'hypothèse avancée par les différents auteurs est que l'infection par HTLV-1 ou l'expression de Tax conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'accélération du cycle cellulaire par Tax nécessiterait donc une inactivation préalable des inhibiteurs des cyclines/CDKs. Ainsi, si la prolifération des cellules infectées est fonction de l'inactivation de certains gènes comme les inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire, cela pourrait en partie expliquer le faible taux de développement d'ATL chez les patients infectés par HTLV-1. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'environ 30% des patients ATL présentent une inactivation des gènes p15^{INK4b}, p16^{INK4a}. Hatta et al., ont d'ailleurs rapporter l'inactivation de ces inhibiteurs comme facteurs de pronostic dans le développement de l'ATL (Hatta et al., 1995).

Au delà de la phase G1, Tax est également capable de perturber la transition G2/M en inhibant les points de contrôle de la phase G2 visant à s'assurer de la duplication à l'identique de l'ADN et au maintien de la ploïdie avant la mitose.

L'aneuploïdie et la formation de micronoyaux sont des caractéristiques des cellules ATL. La ségrégation des chromosomes en deux cellules filles identiques, s'opère lors de la phase M et requiert la duplication préalable des centrosomes en phase G1 et début de la phase S. Un changement dans la duplication est régulièrement observé dans les tumeurs solides, les leucémies ainsi que dans les cancers viro-induits. Des études récentes ont démontré que Tax perturbait la duplication des centrosomes résultant en une aneuploïdie, caractéristique des phases avancées de l'ATL (Ching et al., 2006; Nitta et al., 2006; Peloponese et al., 2005), sans pour autant trouver d'altérations génétiques au niveau des gènes codant pour les protéines responsables du contrôle de la mitose.

En 1998 Jin et al., ont démontré que Tax était capable de se lier et d'inactiver la protéine hSMAD1 (Jin et al., 1998), une protéine impliquée dans le contrôle du fuseau mitotique et capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en cas de mauvaise ségrégation des chromosomes. Cette observation a été par la suite étendue à un grand nombre de cellules transformées par HTLV-1 qui présentent des défauts dans le contrôle du fuseau mitotique (Kasai et al., 2002). En plus de l'inactivation de hSMAD1 il a été mis en évidence qu'à la fois les protéines hSMAD1 et hSMAD2 présentent une localisation cytoplasmique plutôt que nucléaire (Kasai et al., 2002). hSMAD1 est normalement nécessaire pour recruter hSMAD2 au niveau des kinétochores (Chen et al., 1998), l'inactivation de hSMAD1 par Tax perturbe donc la localisation de hSMAD2 affectant ainsi les points de contrôle du fuseau mitotique et favorisant la persistance de micronoyaux dans les cellules infectées par HTLV-1.

Une des questions qui se pose est de savoir si Tax favorise uniquement la persistance de dommages aneuploïdogènes survenus spontanément ou si Tax est aussi capable de les induire.

Cette question a été en partie élucidée par Peloponèse et al., (Peloponèse et al., 2005). Ces auteurs ont montré que Tax était co-localisée avec le centrosome pendant la mitose après s'être fixée à la protéine Ran-binding protein 1 (RanBP1). RanBP1, qui interagit avec les Ran-GTPases, joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des centrosomes. L'inhibition de l'expression de RanBP1 induit la perte de la localisation

de Tax au niveau des centrosomes et une perte de l'apparition de centrosomes surnuméraires. Ces données suggèrent que Tax en s'associant à RanBP1 est capable d'induire la multiplication des centrosomes à l'origine de dommages aneuploïdogènes.

Une protéine centrosomale, Tax1BP2 semble aussi être impliquée dans l'aneuploïdie induite par Tax. Les cellules présentant une concentration élevée de la protéine Tax1BP2 ont peu de centrosomes et des chromosomes surnuméraires alors que des cellules qui expriment une quantité faible de Tax1BP2 montrent une tendance accrue à développer une aneuploïdie (Ching et al., 2006; Pumfery et al., 2006). La protéine Tax1BP2 agirait donc comme régulateur négatif de la duplication des centrosomes (Wong and Stearns, 2003). Tax est capable d'interagir directement avec Tax1BP2 (Ching et al., 2006 ; Pumfery et al., 2006) et cette interaction semble indispensable à la formation de centrosomes surnuméraires.

Enfin la duplication des centrosomes est sous le contrôle de complexes Cyclines/CDKs et notamment de CDK2 dont l'expression, comme nous l'avons décrit plus haut, est up-réglée par Tax, ce qui va favoriser ici encore la duplication anormale des centrosomes.

Tax va donc induire une prolifération cellulaire incontrôlée en agissant à la fois de manière directe et indirecte sur le cycle cellulaire et ses points de contrôle. Cette progression sans contrôle du cycle cellulaire participe également à l'apparition d'aneuploïdie et de micronoyaux suite à la duplication des centrosomes.

2.3.1.4. Tax favorise la mutagenèse

Comme nous venons de le décrire, Tax module l'expression de nombreux gènes en activant des facteurs de transcription à large spectre comme NF- κ B et CREB ou l'activité d'un large éventail de protéines, comme en témoigne son interactome impressionnant (Boxus et al., 2008). Cependant comme évoqué dans le chapitre 2.3.1.3 le développement de pathologies telles que l'ATL résulte aussi de l'inactivation de plusieurs gènes clés dits gènes suppresseurs de tumeurs. Ces inactivations sont le fruit de mutations génétiques et épigénétiques, de délétions de gènes ou de fragments de chromosomes, ou encore de translocations. De façon générale, ces altérations ont été associées à une prolifération accrue, une indépendance aux signaux de survie et

de croissance, une résistance à l'apoptose, une capacité à stimuler l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (métastase) des cellules tumorales.

Les lymphocytes transformés par HTLV-1 isolés de patients tout comme ceux immortalisés en culture montrent une large gamme d'anomalies chromosomiques qui comprennent des délétions, des translocations, des réarrangements, des duplications, et une aneuploïdie (Chieco-Bianchi et al., 1988; Fujimoto et al., 1999; Itoyama et al., 1990; Kamada et al., 1992; Maruyama et al., 1990; Sadamori, 1991; Tanaka et al., 1990; Whang-Peng et al., 1985).

Pour l'heure il n'existe aucune preuve reliant un type spécifique de lésions chromosomiques au développement de ATL. Il est bien établi que Tax a la capacité de favoriser une instabilité génétique et chromosomique de manière indirecte en bloquant les points de contrôle du cycle cellulaire, ou encore en inhibant les voies de réparation de l'ADN, mais aucune preuve de l'implication directe de Tax dans l'induction des dommages de l'ADN n'avait été faite avant 2010 (Majone and Jeang, 2000). En 2010 une étude menée par Kinjo et al., fait état de la production de ROS par Tax dans les cellules infectées, causant des altérations génétiques (Kinjo et al., 2010). Plus récemment une autre étude suggère un rôle potentiel de Tax dans l'induction de dommages à l'ADN suite à la démonstration de l'expression de l'enzyme AID dans des cellules exprimant Tax ainsi que dans certaines cellules ATL (Ishikawa et al., 2011). L'implication directe et indirecte de Tax dans l'apparition et le maintien des dommages à l'ADN sera traitée dans les paragraphes suivants.

2.3.1.4.1. Tax favorise la transformation cellulaire en inhibant les voies de réparation de l'ADN.

Afin de maintenir l'intégrité du génome, les cellules eucaryotes ont développé des mécanismes de réparation en réponse aux dommages de l'ADN. Il existe différentes voies de réparation. La voie du BER dans laquelle la réparation se fait par excision de bases, par exemple à la suite de la désamination d'une cytidine par AID. La voie du NER, va quant à elle exciser les nucléotides comme les dimères de pyrimidines, la voie du MMR (MisMatch Repair) et la réparation par recombinaison et jonction non homologue des brins brisés (NHEJ).

Plusieurs études montrent que Tax perturbe la capacité des cellules à réparer l'ADN endommagé en interférant avec les voies de réparation citées ci-dessus (Ducu et al., 2011; Haoudi et al., 2003; Jeang et al., 1990; Kao et al., 2000; Lemoine et al., 2000; Marriott and Semmes, 2005; Miyake et al., 1999; Philpott and Buehring, 1999), ce qui crée un environnement propice à une réplication avec un maintien de lésions génomiques contribuant ainsi à la transformation cellulaire.

Tax est notamment capable d'inhiber la voie du NER (Kao and Marriott, 1999) en modulant l'expression des facteurs impliqués dans cette voie, en particulier PCNA (Proliferating cell Nuclear Antigen ; Lemoine et al., 2000) un facteur de processivité de la polymérase δ . Tax est capable d'activer le promoteur de PCNA et d'induire sa surexpression résultant en une inhibition de la voie de réparation du NER (Ressler et al., 1997). En cas de dommages à l'ADN la protéine p21 se fixe à PCNA et bloque la réplication de l'ADN dépendante de PCNA. La surexpression de PCNA induite par Tax contrecarre l'effet répresseur de p21 sur PCNA et bloque ainsi la voie du NER ce qui favorise la réplication de l'ADN contenant des lésions par la Pol δ . En réalité cet effet de Tax est dose-dépendant. Une forte concentration en Tax induit la transactivation de PCNA et inhibe le NER alors qu'une plus faible concentration n'aura aucun effet sur le NER (Edwards and Marriott, 2008; Schavinsky-Khrapunsky et al., 2008). Peu de temps après que le rôle de Tax sur la voie NER ait été mis en évidence, Philpott et Buehring ont démontré que Tax affectait aussi la voie du BER (Philpott et Buehring, 1999). Jeang et al., avaient montré que Tax trans-réprimait le promoteur de l'ADN polymérase β qui est impliquée à la fois dans la voie du BER et du MMR (Jeang et al., 1990).

Des cassures d'ADN de type DSB sont fréquemment retrouvées dans les cellules infectées par HTLV-1. Ces cassures peuvent entraîner des translocations et des fragmentations chromosomiques caractéristiques de cellules ATL. L'une des premières réponses aux DSBs est l'activation de la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) qui va servir de point d'ancrage pour la machinerie de réparation de l'ADN et ainsi faciliter la réparation de l'hétérochromatine (Goodarzi et al., 2008). ATM répare les DSBs dans l'ADN par deux mécanismes : la recombinaison homologue entre deux molécules sœurs d'ADN et la NHEJ.

Lorsque des DSBs surviennent dans l'ADN, le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) est recruté au niveau des lésions et recrute à son tour la kinase ATM. Celle-ci, présente normalement dans la cellule sous forme de dimère inactif, s'autophosphoryle au niveau de la sérine 1981, entraînant une dissociation des deux monomères et une activation d'ATM. Elle phosphoryle ensuite l'histone H2AX, une variante de la famille des histones, qui recrute au site d'ADN endommagé plusieurs protéines qui sont phosphorylées par ATM, dont Chk1 et Chk2 activant les points de contrôle du cycle cellulaire, c-Abl activant le processus de recombinaison homologue, BRAC1, qui est impliqué dans la réparation d'ADN et p53, un facteur de transcription activant des gènes de réparation d'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose.

Tax est capable d'atténuer l'effet de la kinase ATM et interfère avec le recrutement de MDC1 (Mediator of DNA-damage Checkpoint 1) en le séquestrant dans des foyers nucléaires autres que ceux présentant des DSBs, évitant ainsi une accumulation stable de ATM au niveau des sites endommagés et perturbant la réparation des DSBs (Chandhasin et al., 2008). L'inhibition par Tax de la voie médiée par ATM favorise la réplication de l'ADN lésé et par conséquent l'accumulation de mutations (Chandhasin et al., 2008). En accord avec ces observations, une plus grande fréquence de mutations du génome cellulaire est observée dans les cellules exprimant Tax. De plus une étude a montré que l'inhibition de la kinase ATM corrélait avec la tumorigénèse. L'inhibition de ATM réprime l'induction de la sénescence induite par des oncogènes conduisant à l'augmentation de la taille des tumeurs et au pouvoir invasif des tumeurs chez la souris (Bartkova et al., 2006).

Un régulateur majeur du point de contrôle G2/M, Chk2 est activé suite à la phosphorylation de la kinase ATM et induit l'arrêt du cycle cellulaire. Il a été démontré que Tax réprimait l'activité de Chk2 soit directement par interaction avec Chk2 soit indirectement en modulant l'activité de ATM (Park et al., 2006). En particulier, Tax est capable de séquestrer Chk2 dans des foyers nucléaires, ce qui induit son auto-hyperphosphorylation et son inactivation, et donc empêche le déclenchement d'une réponse appropriée aux lésions de l'ADN (Gupta et al., 2007). Récemment une étude a identifié le complexe DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase)/Ku70/Ku80 comme faisant partie du complexe Tax/Chk2 (Durkin et al., 2008). Il a été montré que Tax induisait une activation constitutive de la voie DNA-PK par phosphorylation en dehors de tout stress génotoxique, empêchant la mise en

place de réponse à de nouveaux dommages à l'ADN (Durkin et al., 2008). Tax interagit également avec Chk1 et réprime son activité (Park et al., 2004). Tax inhibe aussi l'expression de Ku80 ce qui corrèle avec une nette diminution de la réparation des DSBs (Ducu et al., 2011).

Un autre acteur majeur de la voie ATM mentionné précédemment est la protéine suppresseur de tumeur p53. Suite à l'activation par ATM, p53 va induire l'expression de nombreux gènes dont p21 impliqué dans le point de contrôle G1/S. Les mutations au niveau du gène *p53* sont retrouvées dans près de 50% des cancers humains. Curieusement il est relativement rare de retrouver des mutations dans ce gène dans les cellules infectées par HTLV-1 (Cereseto et al., 1996) et dans les ATL (Gatza et al., 2003) de plus Tax n'est pas capable de se lier à p53 comme certaines protéines d'autres virus. Cependant dans les lymphocytes T exprimant Tax une inhibition de p53 a été observée. Cette inhibition est dépendante de l'activation de la voie NF- κ B par Tax et de la phosphorylation de p53 sur la Ser15 (Pise-Masison et al., 1998). Cependant deux études démontrent que, contrairement aux travaux menés par Pise-Masison, l'inhibition de p53 par Tax serait indépendante de la voie NF- κ B et de la phosphorylation sur la Ser15 mais serait plutôt due à la séquestration du facteur CBP/p300 par Tax ce qui réprimerait l'activité transcriptionnelle de p53 (Ariumi et al., 2000; Suzuki et al., 1999). Finalement plusieurs études ont démontré depuis que ce second modèle était erroné. En effet il semblerait que Tax induise l'interaction entre la sous unité p65/RelA de NF- κ B et p53. Cette interaction est dépendante de la phosphorylation de p53 au niveau des Ser15 et 392 et induit son inactivation transcriptionnelle (Pise-Masison et al., 2000 ; Jeong et al., 2004). Jeong et al ont montré que cette interaction fait intervenir le complexe IKK. En effet Tax va activer IKK2 qui va phosphoryler p65/RelA au niveau de la Ser536 qui va ainsi pouvoir se lier à p53 et l'inactiver (Jeong et al., 2005).

L'interférence avec la voie de signalisation ATM permet à Tax d'augmenter la fréquence des mutations et de créer un environnement favorable à la transformation cellulaire.

2.3.1.4.2. Tax induit directement des mutations au niveau de l'ADN

Un grand nombre de protéines virales sont capables d'induire des dommages à l'ADN notamment via la production de ROS (Reactive Oxygen Species) comme la protéine EBNA-1 (EBV Nuclear Antigen 1) de l'Epstein-Barr virus (EBV ; Gruhne et al., 2009), les protéines core, E1 et NS3 du virus de l'hépatite C (HCV ; Machida et al., 2006) ou encore la protéine vpr du virus HIV-1 ((Deshmane et al., 2009; Nakai-Murakami et al., 2009). Une augmentation de la production de ROS au cours de l'infection par EBV et HCV conduit à une instabilité génomique résultant en des DSBs non réparées qui à terme entraînent l'apparition de mutations et autres altérations génomiques (Gruhne et al., 2009; Machida et al., 2006).

Il est à noter qu'à la fin des années 90, l'équipe de Chlichlia avait démontré, dans des cellules Jurkat exprimant Tax de manière inducible grâce au système ERTax, que l'expression de Tax induisait un état de stress oxydatif (Los et al., 1998) mis en évidence par la présence de glutathion réduit et la présence de peroxyde d'hydrogène. Plus récemment Kinjo et al., ont mis en évidence pour la première fois un rôle direct de Tax dans l'endommagement de l'ADN. L'utilisation d'essai comet a permis de révéler la présence de cassures simple et double brins dans les cellules exprimant Tax (Kinjo et al., 2010). Le traitement des cellules avec un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC) ou un siRNA dirigé contre Tax, inhibe l'induction des dommages à l'ADN (Kinjo et al., 2010) démontrant l'importance des ROS dans l'induction des dommages à l'ADN induits par Tax. Une étude antérieure a démontré que la protéine accessoire p13 serait capable d'induire via la mitochondrie l'expression de ROS (Silic-Benussi et al., 2004). Ainsi p13 pourrait coopérer avec Tax dans l'augmentation du niveau de ROS intracellulaires et l'accumulation de lésions génétiques et génomiques.

La mise en évidence de l'augmentation du taux de ROS dans les cellules exprimant Tax fournit la première preuve d'un rôle direct de Tax dans l'induction de dommages de l'ADN, alors que Tax jusque là était connue pour induire un environnement favorable à l'apparition de lésions de l'ADN et favoriser la persistance de dommages apparus spontanément. Cependant, ces études sur les ROS ont été faites sur des lignées cellulaires transduites avec un vecteur permettant l'expression

de Tax. L'implication des ROS dans l'initiation de la tumorigenèse associée à l'infection par HTLV-1 reste donc pleinement à démontrer.

Très récemment un nouveau candidat dans les endommagements de l'ADN a été mis en lumière dans des cellules infectées par HTLV-1. Les auteurs ont démontré que les transcrits de AID étaient exprimés dans des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 et dans des cellules ATL (Ishikawa et al., 2011). De plus l'utilisation de mutants de Tax incapables de se lier soit à NF- κ B soit à CREB et l'analyse en gel retard du promoteur de AID dans des lignées infectées par HTLV-1 ont démontré que l'activation du promoteur de AID par Tax se faisait principalement par le biais de la voie classique de NF- κ B (Ishikawa et al., 2011). La découverte de l'expression de AID dans les lignées infectées par HTLV-1 ainsi que dans des cellules ATL fournit une nouvelle piste pour l'apparition de lésions génomiques favorisant la transformation cellulaire. En effet, la capacité de AID à générer des DSB et des translocations en fait une protéine candidate dans l'instabilité génétique et chromosomique caractéristique des cellules ATL.

De plus les études menées sur des souris transgéniques exprimant constitutivement AID révélant un développement spontané de lymphomes T, renforcent l'idée que AID pourrait jouer un rôle dans le développement de cellules T tumorales dans un contexte infectieux et/ou inflammatoire. Cependant à ce jour des études approfondies sur le rôle de AID dans l'apparition de lésions au niveau de l'ADN dans les cellules T humaines infectées par HTLV-1 restent à être menées.

En résumé l'oncoprotéine Tax est non-seulement indispensable à l'expression du génome viral mais possède aussi un gigantesque pouvoir oncogène à l'origine de la transformation des cellules infectées par HTLV-1. Sa capacité à activer des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie des lymphocytes tels que les voies NF- κ B ou AP-1, sa capacité à interagir directement avec des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou encore sa capacité à inhiber les voies de réparation de l'ADN, convergent pour favoriser l'apparition et la persistance de lésions de l'ADN. La récente mise en évidence de la capacité de Tax à directement induire des endommagements de l'ADN en induisant l'expression de ROS et plus encore celle de AID ne fait que renforcer la certitude que Tax joue un rôle crucial dans l'instabilité génétique et chromosomique des cellules HTLV-1⁺ ainsi que dans le développement de l'ATL. En effet la capacité de AID à induire des mutations somatiques en dehors des loci des Igs et à induire des DSB en font un facteur potentiellement clé dans l'instabilité génomique caractéristique des cellules ATL. Les cellules ATL accumulent un grand nombre et une grande diversité de lésions de l'ADN. Chaque type de lésion est normalement réparé par un mécanisme spécifique de cette lésion. En bloquant les voies de réparation Tax permet à ses lésions de perdurer. Cependant dans un contexte physiologique, lorsque les lésions sont trop nombreuses et trop importante, la cellule est éliminée par apoptose. Ceci suggère fortement que les cellules T infectées par HTLV-1 mettent en place des mécanismes de survie les protégeant de l'apoptose.

3. Dérégulation de l'apoptose et persistance des dommages à l'ADN : Implication de BFL-1.

La mort cellulaire est un processus physiologique permettant l'élimination d'une cellule anormale (infectée, endommagée, cancéreuse). Il existe différents types de mort cellulaire tels que la nécrose, la sénescence, l'autophagie, la pyroptose ou encore l'apoptose. Ces types de mort cellulaire s'activent en réponse à des stimuli bien précis mais peuvent également agir en synergie ou s'inhiber les uns les autres. L'équilibre entre prolifération et mort cellulaire permet d'assurer l'homéostasie cellulaire. Dans le cas d'infections virales ou de transformation cellulaire, la mort cellulaire apparaît comme le dernier rempart protégeant l'organisme. De nombreux virus ont développé des techniques pour inhiber les différentes formes de mort cellulaire et favoriser la survie et la prolifération des cellules infectées. Ces mécanismes seront détaillés dans ce paragraphe.

3.1. L'apoptose, un mécanisme essentiel à l'homéostasie cellulaire

L'apoptose est un mécanisme physiologique d'autodestruction en réponse à une grande variété de stress cellulaires. Il s'agit d'un mécanisme ubiquitaire à tous les métazoaires, qui atteint un haut niveau de complexité chez les vertébrés. L'apoptose est un processus hautement régulé qui s'appuie sur différentes voies de signalisation, en fonction de la nature du signal et des cellules.

Chez les mammifères, la mort par apoptose est essentielle au cours de l'embryogenèse (développement du cerveau, différenciation de doigt) et est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire pour maintenir l'homéostasie. Un déséquilibre dans la régulation de l'apoptose peut contribuer au développement soit, dans le cas d'une apoptose défailante, de cancers ou de maladies auto-immunes, soit dans le cas d'une apoptose exacerbée, de maladies dégénératives ou d'une immunosuppression.

Les premières manifestations de l'apoptose se caractérisent par une condensation et une marginalisation de la chromatine, une convolution des membranes plasmiques et nucléaires. Par la suite le noyau se fragmente et des corps apoptotiques se forment exprimant à leur surface des phosphatidylsérines qui

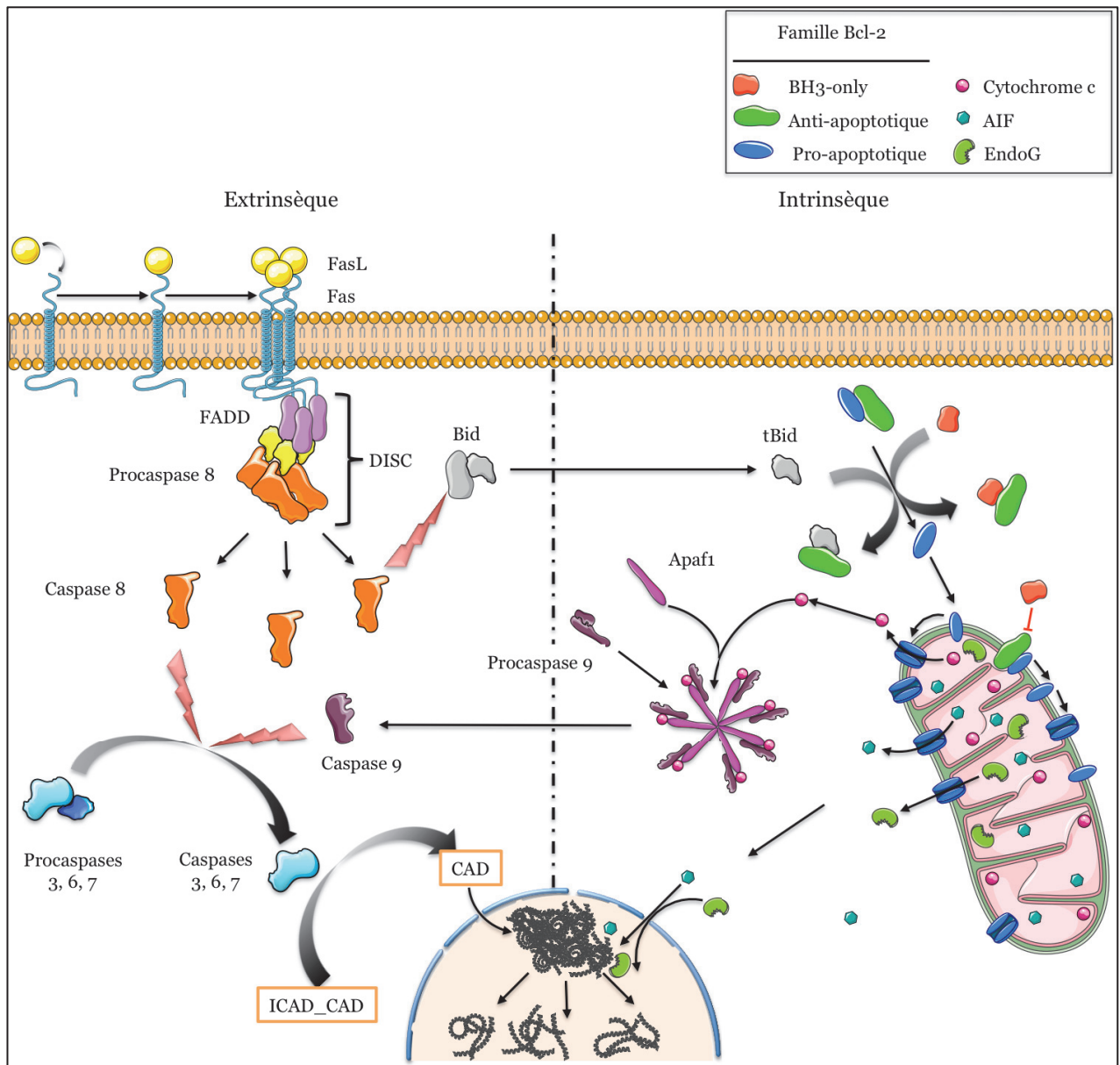


Figure 17 : Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque régulant l'apoptose. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est sous le contrôle des membres de la famille Bcl-2. La perméabilisation irréversible de la membrane mitochondriale par Bax/Bak va permettre le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c qui va activer la voie caspase-dépendante, ainsi que des facteurs AIF et EndoG qui vont induire la fragmentation de l'ADN. La voie extrinsèque ou voie des caspases est médiée par l'activation des récepteurs de mort de type TNF. La liaison ligand/récepteur va induire l'activation de la caspase 8 qui va pouvoir i) induire directement l'apoptose en activant les caspases 3, 6 et 7 permettant la libération du facteur CAD, conduisant à la fragmentation de l'ADN et à l'apoptose, ii) activer la voie mitochondriale en clivant la protéine Bid en tBid, un BH3-only de la famille Bcl-2 qui va permettre la perméabilisation de la mitochondrie par Bax/Bak. Les deux voies ne sont pas exclusives et peuvent coopérer pour une régulation optimale de l'apoptose.

permettront leur phagocytose. L'intégrité des membranes étant préservée au cours de ce processus, le contenu cytoplasmique ne sera pas déversé dans le milieu extracellulaire et aucune réaction inflammatoire ne sera déclenchée.

Les signaux apoptotiques convergent vers deux voies. Dans le cas de stress, tels que la privation de facteurs de croissance, des dommages à l'ADN ou lors de la signalisation des récepteurs à dépendance, c'est la voie intrinsèque ou voie mitochondriale, régulée par des membres de la famille Bcl-2, qui est activée. Dans le cas de l'engagement des récepteurs de mort de la superfamille des récepteurs au TNF, c'est la voie extrinsèque, qui est stimulée (Figure 17).

La voie intrinsèque implique la mitochondrie et est sous le contrôle de protéines de la famille Bcl-2. Les interactions entre les membres de la famille Bcl-2 pour réguler l'apoptose seront détaillées dans le paragraphe suivant. La phase effectrice de l'apoptose implique la dépolarisation et l'ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries, ce qui conduit au relargage du cytochrome c, du facteur induisant l'apoptose (AIF), de l'endonucléase G (EndoG), et de Smac/Diablo. Ces facteurs induisent l'apoptose par deux voies, une voie caspase-indépendante et une voie caspase-dépendante.

La voie AIF/EndoG est indépendante des caspases. Les facteurs AIF et EndoG passent dans le cytosol puis dans le noyau, où ils induisent la fragmentation de l'ADN.

La seconde voie est initiée par la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c se lie alors au facteur d'activation de la protéase apoptotique (APAF-1), qui recrute alors la pro-caspase 9. Le complexe formé, appelé apoptosome induit l'auto-activation de la caspase 9, qui est capable d'activer les caspases effectrices (3, 6 et 7). L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase), ce qui permet la libération de CAD (Caspase Activated DNase), qui entre dans le noyau et fragmente l'ADN. Une fois les facteurs mitochondriaux libérés et les caspases activées, le processus de l'apoptose est irréversible.

L'activation de la voie extrinsèque, par l'engagement des récepteurs de mort comme Fas va induire leurs oligomérisation permettant ainsi le recrutement de la molécule FADD (Fas Associated Death Domain) et de la pro-caspase 8 formant un

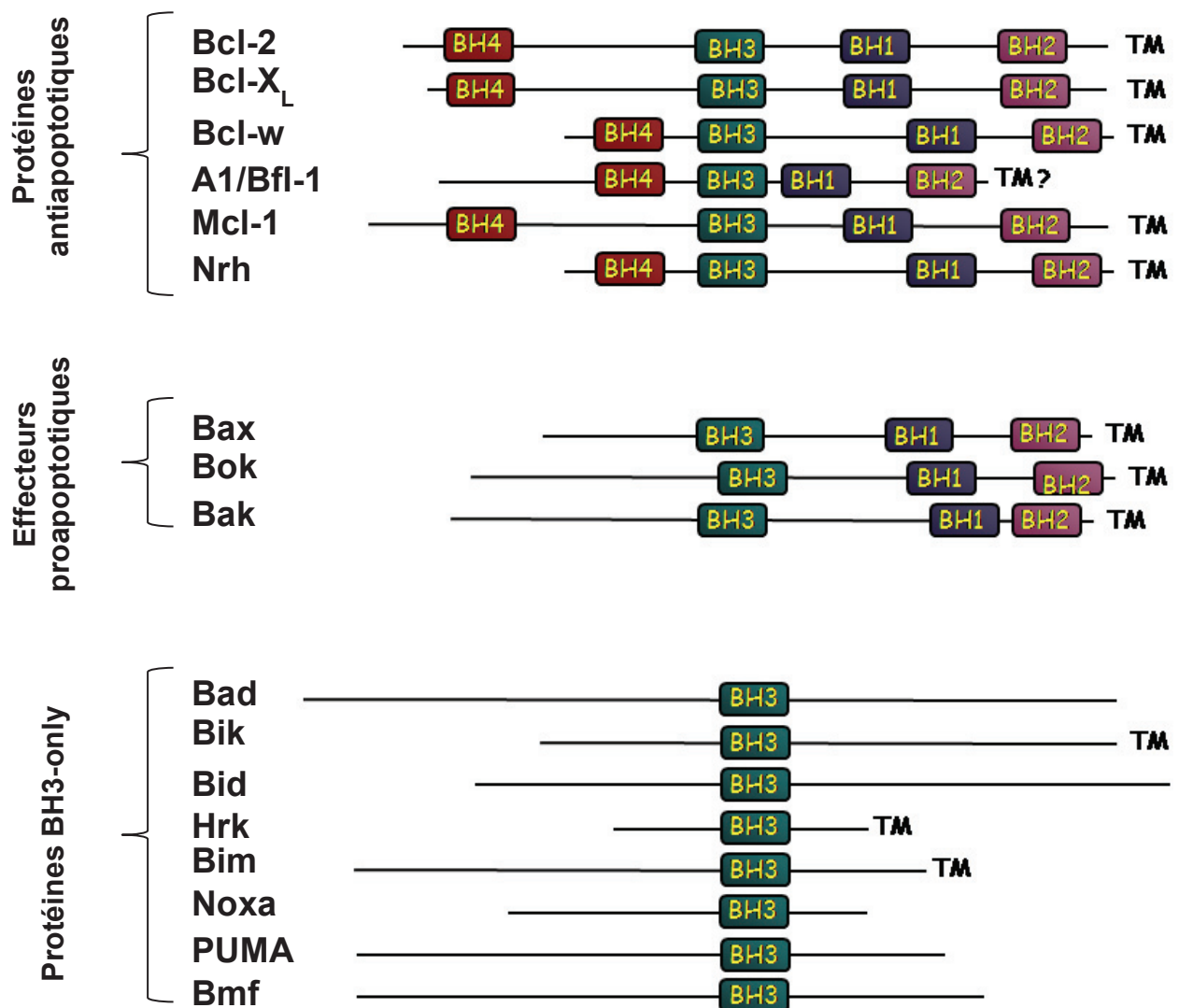


Figure 18 : Structure primaire des différents membres de la famille Bcl-2. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent toutes les 4 domaines BH ainsi qu'un domaine transmembranaire permettant leur ancrage dans les membranes cellulaires. Seul Bfl-1 n'épossède pas de domaine TM classique. Les membres pro-apoptotiques effecteurs ne possèdent eux que les domaines BH1, BH2 et BH3 ainsi qu'un domaine TM. Les membres anti-apoptotiques BH3-only n'épossèdent que le domaine BH3 comme leur nom l'indique. Certains d'entre eux possèdent un domaine TM permettant l'interaction avec les anti- et pro-apoptotique au niveau de la membrane mitochondriale.

complexe appelé DISC. La formation de ce complexe induit l'auto-activation de la caspase 8. L'activation de la caspase 8 entraîne en cascade l'activation des caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7. Comme dans la voie intrinsèque, l'activation de ces caspases va permettre la libération de CAD qui après translocation dans le noyau et fragmentera l'ADN

- Interconnexions entre les voies intrinsèques et extrinsèques.

Outre le fait qu'à la fois la voie intrinsèque, par le biais de la caspase 9, et la voie extrinsèque, par le biais de la caspase 8, sont capables d'activer les caspases 3, 6 et 7, il est à noter que la voie extrinsèque peut activer la voie intrinsèque. En effet, Bid un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 sert de lien entre les deux voies. Bid est un des substrats de la caspase 8 après engagement des récepteurs de mort. Le fragment C-terminal (tBid) résultant du clivage par la caspase 8 induit l'activation de Bax/Bak, deux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 par changement conformationnel. Ceci montre bien que les deux voies sont interconnectées et forment une boucle d'amplification qui améliore l'efficacité de l'apoptose.

3.1.1. Les membres de la famille Bcl-2

Le premier membre de la famille Bcl-2 identifié, est la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) elle-même. Elle a été décrite pour la première fois lors de l'étude de la translocation chromosomique t(14;18) dans un lymphome folliculaire à cellules B (Tsujimoto et al., 1985).

Les membres de la famille Bcl-2 partagent un ou plusieurs des quatre domaines d'homologies caractéristiques des Bcl-2 (Bcl-2 Homology; BH1, BH2, BH3 et BH4). Cette famille qui compte une vingtaine de membres, contient à la fois des membres pro- et anti-apoptotiques divisés en 3 groupes i) les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines (Bcl-2, Bcl-X_L, Bfl-1, Mcl-1, Bcl-w...), ii) les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines ou effecteurs pro-apoptotiques (Bax, Bak,) et iii) les protéines BH3-only (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bim...) (Figure 18).

Les effecteurs pro-apoptotiques sont absolument requis pour induire l'apoptose.

Les protéines pro- et anti-apoptotiques à multi-domaines partagent 3 des 4 domaines conservés BH (BH1-3).

Les BH3-only eux ne contiennent que le domaine amphipathique BH3 nécessaire à leur activité pro-apoptotique.

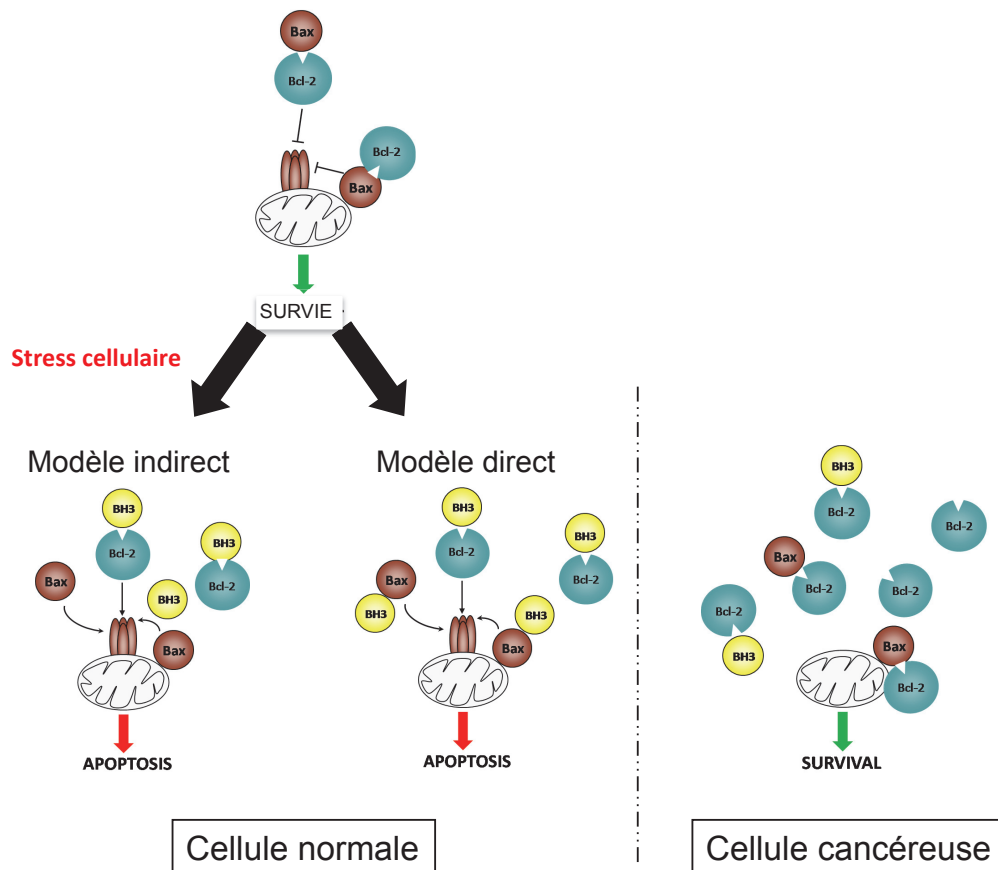
Tous les membres à multi-domaines et certains BH3-only, à l'exception de Bad et Bid, possèdent un domaine transmembranaire TM au niveau de leur région C-terminale, permettant un ancrage dans les membranes comme la membrane mitochondriale ou la membrane nucléaire.

Bfl-1, le plus petit membre anti-apoptotique de la famille. Il est dépourvu de domaine TM classique et possède à la place une séquence d'ancrage amphiphile avec 3 acides amines chargés qui diffèrent de ceux des autres protéines anti-apoptotiques (Brien et al., 2009; Nguyen et al., 1993). Les domaines TM confèrent aux effecteurs pro-apoptotiques une forte activité apoptotique, basée sur leur capacité à former des pores et des canaux ioniques dans les membranes. De la même manière le domaine TM permet aux membres anti-apoptotiques et aux BH3-only qui en possèdent un, de réguler l'activité des effecteurs pro-apoptotiques au niveau des membranes.

3.1.1.1. Jeu d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose par un jeu d'interactions entre protéines pro- et anti-apoptotiques. Le devenir de la cellule dépend donc du niveau d'expression de chaque membre de la famille Bcl-2. Dans une cellule normale la balance penche en faveur d'une survie. Les membres anti-apoptotiques interagissent avec les effecteurs pro-apoptotiques Bax et Bak prévenant ainsi leur oligomérisation et la formation de pores dans la membrane mitochondriale (Figure 19A). Dans des conditions de stress cellulaire, il y a une augmentation de l'expression des protéines de type BH3-only. Selon le modèle d'activation indirecte, les protéines BH3-only interagissent alors avec les membres anti-apoptotiques, libérant ainsi les protéines Bax et Bak qui vont pouvoir s'oligomériser et interagir avec la protéine mitochondrial VDAC (Voltage-dependent Anion-selective Channel). Il en résulte de cette interaction une dépolarisation et une perforation de la membrane mitochondriale permettant ainsi le relargage dans le cytosol du cytochrome c, d'AIF et de l'EndoG.

A



B

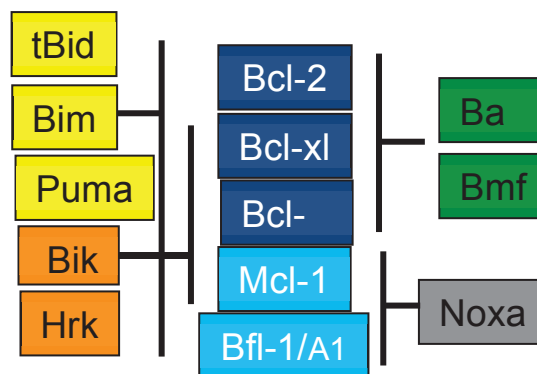


Figure 19 : Jeu d'interactions entre les membres pro- et anti-apoptotique de la famille Bcl-2 dans les cellules saines et les cellules cancéreuses. A) Dans une cellule saine (à gauche) les membres anti-apoptotiques se fixent aux effecteurs apoptotiques et inhibent leur oligomérisation. La réception de signaux de mort va conduire à l'expression des membres pro-apoptotiques multidomains qui vont séquestrer les anti-apoptotiques permettant ainsi leur oligomérisation et de ce fait la perméabilisation de la membrane mitochondriale induisant l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses (à droite) les membres anti-apoptotiques sont surexprimés alors que les pro-apptotiques sont réprimés. Cette balance en faveur du surnombre des anti-apoptotiques va permettre la survie des cellules cancéreuses. B) Profil d'interaction des membres de la famille de la famille Bcl-2. L'affinité sélective entre les membres pro- et anti-apoptotiques est illustrée par les différentes couleurs. Alors que tBid, Bim et Puma peuvent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques, Noxa ne peut interagir qu'avec Mcl-1 et Bfl-1.

Un second modèle d'activation directe a été proposé. Ce modèle suggère que les protéines de type BH3-only en plus d'interagir avec les membres anti-apoptotiques, sont capables d'interagir directement avec les effecteurs Bax et Bak pour induire leur changement de conformation afin de former des pores dans la membrane mitochondriale (pour revue (Danial, 2007)).

Ces deux modes d'action ne sont pas exclusifs et dépendent du type cellulaire et du stimulus (Letai et al., 2002) (Figure 19A).

Un autre degré de complexité dans le jeu d'interaction entre les membres de la famille Bcl-2 est à noter. En effet il apparaît que tous les membres de la famille Bcl-2 ne soient pas capables d'interagir entre eux. Des affinités sélectives ont été mises en évidence (Figure 19B). Par exemple Bim et tBid sont capables d'interagir avec tous les membres anti-apoptotiques alors que Noxa ne peut interagir qu'avec Bfl-1 et Mcl-1. De même Bcl-2 et Bcl-x_L peuvent interagir avec Bid et tBid alors que Bfl-1 et Mcl-1 n'interagissent qu'avec tBid. Bfl-1 est également capable d'interagir directement avec Bak et d'empêcher son oligomérisation (Simmons et al., 2008).

3.1.1.2. Dérégulation de l'expression de la famille Bcl-2, résistance à l'apoptose et chimiorésistance

Une surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 a été associée à la tumorigenèse et à la chimiorésistance de cellules cancéreuses. En particulier les protéines Bcl-2, Bcl-x_L et Bfl-1 sont surexprimées dans de nombreux lymphomes/leucémies. En plus de leur rôle dans la survie des cellules, Bcl-2 et Bcl-x_L ont un effet anti-prolifératif dépendant leur domaine N-terminal. De façon intéressante Bfl-1 dont le domaine N-terminal présente peu d'homologie avec les autres membres anti-apoptotiques peut induire la prolifération. Ce double effet de Bfl-1, fait de Bfl-1 un proto-oncogène de choix.

Dans ce travail de thèse nous sommes concentrés sur la protéine anti-apoptotique Bfl-1. Une surexpression de Bfl-1 est retrouvée dans de nombreuses

lignées cellulaires dérivées de d'hémathies malignes B ou de tumeurs solides (De La Fuente *et al.* 2002; (Xia et al., 2006).

Des approches par analyse de transcriptomes ont permis d'identifier *bfl-1* comme un gène signature dans certains sous-types de DLBCL (Feuerhake et al., 2005), mais aussi de mettre en évidence qu'un fort niveau d'expression de Bfl-1 permet de discriminer les formes indolentes non-progressives de B-CLL de celles progressives et résistantes à la chimiothérapie (Morales et al., 2005). Enfin, la diminution de l'expression de Bfl-1 par l'utilisation de shRNA, induit l'apoptose des lignées cellulaires issues de lymphomes B ainsi que de cellules B-CLL de patients résistants à la fludarabine et sensibilise ces cellules à l'utilisation d'agents anti-cancéreux comme l'anti-CD20 (Rituximab), la doxorubicine, la cisplatine ou encore la fludarabine (Brien et al., 2007; Olsson et al., 2007).

Ces données suggèrent que *bfl-1* peut être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de lymphomes B.

3.1.1.3. Modulation de l'expression de Bfl-1 par Tax

L'activation du gène de *bfl-1* est sous le contrôle des voies NF- κ B et AP-1, deux voies utilisés par un grand nombre de protéines virales pour moduler l'expression de gènes cellulaires. Notamment il a été montré que la protéine LMP1 (latent Membrane Protein 1) du virus Epstein-Barr est capable d'up-réguler l'expression de Bfl-1 en interagissant avec des composantes de la voie de signalisation de CD40, ainsi qu'avec les voies NF- κ B et AP-1 (D'Souza et al., 2004). Ces données suggèrent que Bfl-1 pourrait jouer un rôle dans la survie des cellules infectées et favoriser le développement de lymphome de Burkitt dans le cas d'une infection par EBV.

Tout comme dans le cas d'une infection par EBV, certaines données de la littérature suggèrent un rôle potentiel de Bfl-1 au cours de l'infection par HTLV-1. Tout d'abord, l'utilisation des puces à ADN a permis de mettre en évidence une surexpression de *bfl-1* dans des PBMC immortalisés issus de patients HTLV-1⁺ comparativement à l'expression de Bfl-1 dans des PBMC provenant de patients sains (Harhaj et al., 1999). De la Fuente et al., ont par la suite démontré que l'up-régulation de Bfl-1 dans les cellules HTLV-1⁺ était induite par Tax. Partant de ces observations il est légitime de penser que Tax va induire l'activation du promoteur de *bfl-1* via les

voies NF- κ B et AP-1 dans les cellules infectées par HTLV-1.

Le développement de l'ATL étant un processus long et la démonstration qu'un clone ATL puisse persister 7 ans chez un patient suggèrent comme nous l'avons évoqué que les mécanismes de survie mis en place sont fortement impliqués dans le développement de la pathologie. La protéine Bfl-1 pourrait donc être impliquée à la fois dans la survie et la chimiorésistance des cellules infectées par HTLV-1 et des cellules ATL mais aussi dans la prolifération clonale de ces cellules. A ce jour aucun rôle de Bfl-1 dans la survie ou la chimiorésistance des cellules HTLV-1⁺ n'a été démontré.

Résultats

4. Contexte des travaux de thèse et résultats principaux

4.1. Article 1 : Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase

4.1.1. Principaux résultats

Lorsque nous avons démarré ce projet, l'équipe de Mori avait pour la première fois mis en évidence une expression de AID dans les cellules T humaines, ceci dans le contexte d'une infection par HTLV-1. Les auteurs ont retrouvé les transcrits de AID dans des lignées cellulaires dérivant de patients ATL, ainsi que dans certaines cellules ATL. De plus, l'utilisation de mutants de Tax incapables d'activer la voie NF- κ B dans des essais luciférase ainsi que l'étude du promoteur de *aicda* et l'utilisation de la technique de gel retard ont permis aux auteurs de démontrer que Tax activait la transcription de AID principalement par la voie NF- κ B. Cependant ces travaux n'apportent aucun élément permettant de définir le rôle de AID dans l'instabilité génomique des cellules infectées par HTLV-1. Une partie importante de mon travail de thèse a donc consisté à développer des expériences afin d'évaluer l'implication de AID dans les dommages à l'ADN induits dans les cellules T lors d'une infection par HTLV-1 (Article 1 : Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase, en préparation).

Nous avons donc dans un premier temps validé les résultats de Mori en analysant par RT-qPCR le niveau d'expression des transcrits de AID dans des lignées cellulaires T HTLV-1+ ainsi que dans les cellules JPX-9, cellules T dans lesquelles l'expression de Tax est inductible par ajout de chlorure de cadmium (CdCl₂). Nous avons montré que toutes les lignées cellulaires T HTLV-1+, mais pas les lignées HTLV-1- (Figure S2, Article 1), et les JPX-9 Tax+ (data not shown) expriment les transcrits de AID. Nous avons également retrouvé des transcrits de AID dans des cellules Molt4 transduites avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax alors que les cellules non-transduites ou transduites avec le vecteur contrôle n'expriment pas les transcrits de AID (Figure S4, Article 1). Ces résultats ont été validés au niveau protéique (Figure 3, S2, S5, Article 1).

Afin de se rapprocher au maximum des conditions physiopathologiques du développement de l'ATL, nous avons dans un premier temps infecté des cellules T

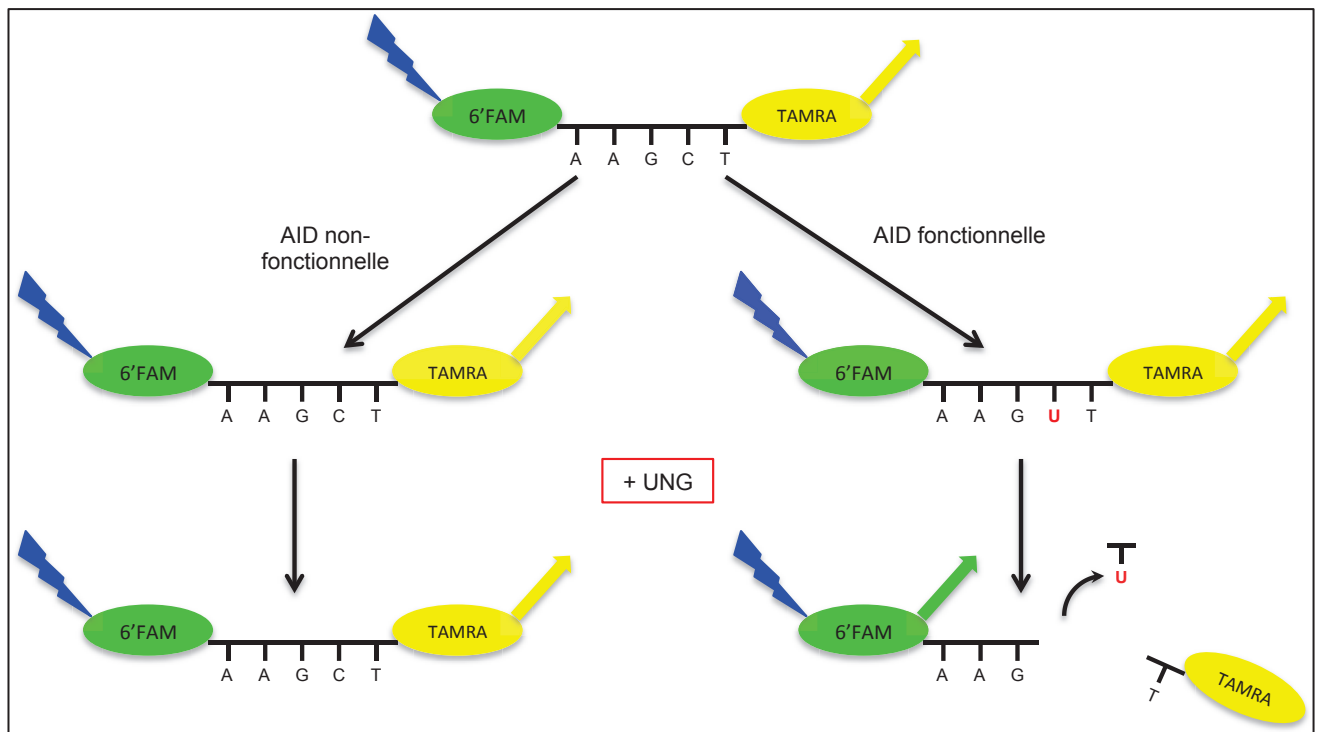


Figure 20 : Schéma du principe de la technique basée sur le FRET. Les oligonucléotides sont flanqués d'un 5'-6-FAM et d'un 3'-TAMRA. Après excitation, la fluorescence émise par 6-Fam est quenchée par TAMRA. En présence d'AID fonctionnelle, la séquence 5'AGCT3' sera désaminée. Le dU généré sera excisé par l'addition de l'UNG. La DSB ainsi créée va permettre la séparation de 6-FAM et TAMRA, la longueur d'onde d'émission de 6-FAM pourra ainsi être mesurée par un luminomètre.

CD4⁺ primaires, avec le virus HTLV-1 par co-culture avec des cellules MT-2 productrices du virus HTLV-1. Nous avons observé que les LT CD4⁺ infectées mais pas les non-infectées expriment un fort taux de transcrits ainsi que de protéine AID (Figure 1a, Article 1).

Dans un second temps et en collaboration avec le groupe de Madeleine Duc-Dodon, nous avons utilisé des souris Rag2^{-/-}γc^{-/-} (BRG) humanisées et infectées par HTLV-1. Les nouveaux nés BRG, après avoir été irradiés, ont été injectés avec des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ humains. A l'âge adulte, les souris humanisées sont infectées par le virus HTLV-1 par injections intrapéritonéale de cellules MT-2 irradiées, ce qui a conduit chez ces souris à une lymphoprolifération et à un développement de lymphomes T semblables à l'ATL (Villaudy et al., 2011). L'analyse en PCR en temps réel des splénocytes de souris humanisées infectées ou non par HTLV-1, a révélé la présence des messagers de Tax ainsi que ceux de AID dans les souris humanisées infectées. Ces résultats ont été confirmés dans un second modèle de souris humanisées et infectées par HTLV-1, les souris NOD-Scid γc^{-/-} (NSG) dont la prise de greffe des cellules humaine est nettement supérieure et qui présente un taux d'envahissement de LT infectés dans le sang supérieur à 85%. A partir des rates de ces souris, les splénocytes ont été mis en culture et les cellules CD4⁺ leucémiques qui ont proliférées en prenant le dessus sur les autres cellules ont été étudiées. Nous avons notamment analysé le niveau des transcrits de AID dans ces cellules en comparaison à des LT CD4⁺ non infectés. Nous avons observé que seuls les LT CD4⁺ infectés expriment les transcrits de AID (Figure 1c, Article 1).

Afin de démontrer que AID est fonctionnelle dans les cellules exprimant Tax ou infectées par HTLV-1 deux techniques ont été utilisées. La première technique consiste à mesurer *in vitro* l'activité de AID. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole basé sur le FRET permettant de montrer que AID pouvait désaminer les dC sur un oligonucléotide de synthèse. Nous avons donc construit des oligonucléotides contenant, soit la séquence cible de AID (AGCT), soit une séquence riche en AT (ATTT) en contrôle négatif. Ces séquences ont été flanquées en 5' d'un 6-FAM et en 3' d'un TAMRA. Le principe est de mettre AID en présence de ces oligonucléotides séparément, d'ajouter de l'UNG et de mesurer la longueur d'onde émise par 6-FAM. Si AID est fonctionnelle les dCs des séquences AGCT seront désaminés en dUs qui seront excisés par l'UNG. La fluorescence de 6-FAM qui était

captée par TAMRA sera ainsi récupérée et lue par un luminomètre. Si AID n'est pas fonctionnelle, les oligonucléotides ne seront pas clivés et seule la fluorescence de TAMRA sera lue. Nous avons observé une augmentation de la fluorescence émise par 6-Fam dans les puits contenant les cellules exprimant AID mais pas dans les puits où l'expression de AID a été éteinte. Ces données indiquent que AID est capable de désaminer les dCs *in vitro*. La deuxième technique utilisée vise à confirmer *ex vivo* la capacité de AID à éditer le génome. Nous sommes donc en train d'analyser nos échantillons en spectrométrie de masse afin de détecter les dUs dans l'ADN génomique. Nos premiers résultats sont encourageant puisque nous avons pu démontrer que les cellules infectées par HTLV-1 exprimant AID présentaient en moyenne 5 fois plus de dUs que les cellules non infectées. Cependant ces résultats demandent confirmation afin de s'assurer de la validité de l'expérience. Ces résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo* montrent très clairement que AID exerce une activité désaminase dans les LT CD4⁺ infectées par HTLV-1.

La suite du projet a consisté à évaluer la capacité de AID à générer des dommages à l'ADN dans les cellules exprimant Tax ou infectées par HTLV-1. Pour ce faire, nous avons invalidé l'expression de AID à l'aide d'un shRNA spécifique de AID, les deux modèles de lignées cellulaires T décrits ci-dessus, les cellules MOLT4 transduites avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax et les cellules JPX-9 dans lesquelles l'expression de Tax est induite par un traitement au CdCl₂. Les dommages à l'ADN ont été visualisés par marquage de la forme phosphorylée de l'histone γ H2AX par microscopie confocale. Nous avons pu mettre en évidence que l'extinction de AID, validée par Western Blot, réduisait de manière très significative les dommages à l'ADN induit par Tax, indiquant pour la première fois que AID pourrait jouer un rôle dans les endommagements de l'ADN induit par Tax. Toujours dans l'optique de se rapprocher le plus possible des conditions physiopathologiques d'une infection par HTLV-1, nous avons testé si AID pouvait induire des dommages à l'ADN dans des LT CD4⁺ primaires infectés par HTLV-1. L'analyse en microscopie confocale de γ H2AX a révélé que les LT CD4⁺ infectés préalablement transduits avec le shRNA anti-AID présentaient un marquage γ H2AX beaucoup plus faible que les LT CD4⁺ infectés exprimant AID. Ces résultats démontrent que AID joue un rôle dans les endommagements à l'ADN dans les LT CD4⁺ lors d'une infection par HTLV-1.

Le marquage de la forme phosphorylée γ H2AX ne permet de visualiser que l'activation des systèmes de réparation de l'ADN. En effet, l'histone H2AX est phosphorylée dès que la réplication est interrompue, comme cela peut être le cas lors d'un mésappariement ou lors de cassures de type SSB ou de DSB. Cette technique ne permet donc pas de visualiser uniquement les cassures de l'ADN. Afin de visualiser spécifiquement les cassures de l'ADN nous avons utilisé la technique d'essai comète en condition alcaline qui permet de visualiser à la fois les SSB et les DSB. L'analyse du Tail moment qui prend en considération la longueur de la queue de comète et le pourcentage d'ADN génomique présent dans la queue, nous a permis de démontrer que l'expression de AID induisait des cassures de l'ADN dans les LT CD4⁺ infectés par HTLV-1.

Les données récoltées lors de ce projet de thèse démontrent clairement pour la première fois que l'infection par HTLV-1 de LT CD4⁺ primaires était associée à une forte activité cytidine déaminase de AID ainsi qu'à un enrichissement de l'ADN génomique en uracile. L'expression de AID dans les LT CD4⁺ infectés est également associée à des endommagements de l'ADN et notamment des cassures de l'ADN. Ces résultats suggèrent un rôle de AID dans l'instabilité génétique et chromosomique participant au processus de leucémogénèse des cellules infectées par HTLV-1.

4.1.2. Article 1 : Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase

Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces DNA damages through activation-induced cytidine deaminase

Aurélien Riquet¹, Vanessa Szablewski^{2,3}, Sébastien Chevalier⁴, Julien Villaudy⁵, Eléonore Péres⁵, Louis Gazzolo⁵, Renaud Mahieux^{4*}, Madeleine Duc-Dodon^{5*} and Nathalie Bonnefoy³.

¹ Centre de Recherche International en Infectiologie, Université de Lyon, France; INSERM, U1111, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France

² Département de Biopathologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université Montpellier 1, F-34295 Montpellier, France

³ IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier; INSERM, U896; Université Montpellier 1; CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, F-34298, France.

⁴ Equipe Oncogenèse Rétrovirale Equipe labellisée "Ligue Nationale Contre le Cancer" International Center for Research in Infectiology, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 Ecole Normale Supérieure de Lyon Université Lyon 1, Lyon, 69364 Cedex 07

⁵ Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Unité Mixte de Recherche 5239, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure, UMS3444 BioSciences Lyon-Gerland, Lyon, France.

4.1.3. Article

Abstract

Activation-induced cytidine deaminase (AID) is a member of the AID/APOBEC family that is physiologically expressed in germinal center B cells where its function is essential to antibody diversification. AID activity outside immunoglobulin loci is associated with gene mutations and chromosomal translocations frequently observed in human B-cell lymphomas and leukemias. It has also recently been associated with inflammation-mediated genomic instability in non-B cells where it contributes to accumulation of somatic mutations in tumor-related genes. We showed here that AID expression is induced in primary CD4⁺ T cells following human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection both *in vitro* and in vivo in human hemato-lymphoid system (HHLS) mice. We demonstrated that AID expressed in HTLV-1-infected CD4⁺ primary T cells and splenic T lymphoma from infected mice is functional and that it drives Tax-mediated DNA damages. Altogether these data suggest that AID could play a key role in leukemogenesis of HTLV-1-infected CD4⁺ T cells by affecting genomic stability.

Activation induced cytidine deaminase (AID) belongs to the human Apolipoprotein B mRNA editing complex catalytic polypeptide (APOBEC) family of cytidine deaminases that act as editors on DNA (APOBEC1 and 3) and RNA (APOBEC1). While most of the APOBEC proteins exhibit mutagenic activity against viral endogenous and exogenous genomes (retroviruses, papillomaviruses, hepatitis B virus), AID promotes the deamination of cytidine residues on cellular single strand DNA during gene transcription (Conticello, 2008; Ramiro et al., 2003). AID is physiologically expressed in B cells, where it targets the immunoglobulin (Ig) gene loci and initiates both class-switch recombination and somatic hypermutations (Muramatsu et al., 2000), two processes which exploit DNA mismatches to reshape the primary antibody repertoire after antigen encounter (for a review see (Marusawa et al., 2011)). However the editing activity of AID is not restricted to Ig loci and AID can act on a wide spectrum of genomic targets in B cells (Liu et al., 2008 ; Staszewski et al., 2011 ; Yamane et al., 2011; Zan et al., 2009), inducing mutations (Pasqualucci et al., 2008) or translocations (Ramiro et al., 2006; Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008; Robbiani et al., 2009; Rossi et al., 2006), that predispose to the deregulated expression or function of oncogenes and tumor suppressor genes such as p53, *c-myc*, Pim1, RhoH and Pax5 and to the development of B cell malignancies. Besides its role in B cell lymphomagenesis AID also plays a key role in different cancers linked to chronic inflammation (for review see (Shimizu et al., 2012). While not expressed in normal colonic mucosa, AID is present in colonic epithelial cells in patients with colitis-associated colorectal cancer (Endo et al., 2011; Endo et al., 2008), and AID deficiency in IL-10^{-/-} mice, a representative model of human inflammatory bowel disease, reduces the incidence of both the accumulation of somatic mutations in the TP53 gene and the development of colon cancer (Takai et

al., 2011). AID is also expressed in cholangiocarcinoma tissues and bile epithelia in patients with primary sclerosing cholangitis (Komori et al., 2008) and in Barrett's oesophageal adenocarcinoma (Morita et al., 2011). Aberrant expression of AID was further described in gastric cancers following *Helicobacter pylori* infection (Marusawa and Chiba, 2010; Matsumoto et al., 2007) where it is associated with genetic alterations in gastric epithelial cells (Matsumoto et al., 2010), or in hepatocellular carcinoma in the context of hepatitis C virus infection or liver cirrhosis (Endo et al., 2007; Kou et al., 2007). The oncogenic potential of AID in non-B cells is additionally supported by the observation that the constitutive expression of AID invariably leads to T cell lymphomas, and neoplasia in non-lymphoid epithelial tissues (lung microadenoma) in AID transgenic mice (Morisawa et al., 2008; Okazaki et al., 2003). Altogether these results indicate that an aberrant expression of AID is oncogenic by promoting genetic and genomic instability in non-B cells, especially epithelial cells and T cells.

The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), through its transactivator protein Tax, was recently demonstrated to induce AID expression in T cells (Ishikawa et al., 2011). Consistent with this observation, an aberrant expression of AID was observed in HTLV-1-infected T cell lines and in some adult T-cell leukemia (ATL) cells (Fan et al., 2010; Ishikawa et al., 2011), suggesting that AID might be involved in T-cell malignancies in human. However the direct implication of AID in Tax-mediated DNA damages was not demonstrated. ATL is an aggressive T-cell malignancy associated with HTLV-1 infection and characterized by genetic and genomic instabilities (Marriott et al., 2002). How T cells are transformed by HTLV-1 is still incompletely understood, although it is well accepted that the HTLV-1 Tax protein plays a key role in genomic instability in infected cells. Tax, has been directly involved in centrosomal

amplification observed in ATL cells (Afonso et al., 2007; Matsuoka and Jeang, 2011) and in DNA damages through the induction of reactive oxygen species (Kinjo et al., 2010). Furthermore through its ability to disrupt several cell-cycle checkpoints and to interfere with DNA damage repair mechanisms (Baydoun et al., 2012; Chandhasin et al., 2008; Dayaram et al., 2013; Ducu et al., 2011; Iwanaga et al., 2008; Kim et al., 2010; Marriott and Semmes, 2005) or cell death process (Kawakami et al., 1999; Kawakami et al., 2005; Macaire et al., 2012; Mori et al., 2001; Waldele et al., 2006), Tax was additionally proposed to favour persistence of DNA damages and/or survival of cells that contain damaged DNA.

Based on the high incidence of T cell lymphoma in AID transgenic mice (Okazaki et al., 2003) and the previous demonstration that Tax regulates AID expression in T cell lines (Ishikawa et al., 2011) we studied here AID expression and function in HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells and deciphered its direct implication in Tax-mediated DNA damages.

Results

AID is expressed in HTLV-1-infected primary CD4+ T cells.

We first tested whether infection of primary CD4+ T cells by HTLV-1 induces AID expression. To that end, freshly isolated cord blood CD4+ T cells were co-cultured for 7 days with HTLV-1-producing MT-2 cells pre-treated with mitomycin C. Expression of Tax and AID was then analysed within primary CD4+ T cells at both mRNA and protein levels (Fig. 1a,b). Co-culture of CD4+ T cells with mitomycin-treated HTLV-1-producing MT2 cells led to infection of primary T cells as revealed by the strong expression of Tax within CD4+ T cells (Fig. 1a). We observed that infected- but not uninfected-primary CD4+ T-cells expressed high-level of AID mRNA (*aicda*) and protein (Fig. 1a,b). Furthermore, in agreement with our previous results (Macaire et al., 2012), we confirmed that expression of Tax within CD4+ T cells is associated with a strong upregulation of Bfl-1 whereas expression of Bcl-2 remained unaffected (Fig. 1a,b). As a control, the presence of contaminating MT2 cells was carefully controlled by flow cytometry, CD4+ CD3- T cells (i.e. MT2) represented less than 0.4% of cells following 1 month of culture (Supplementary Fig. S1).

These results indicate that AID is expressed in HTLV-1-infected primary CD4+ T cells and are consistent with previous observations which reported that HTLV-1-infected or Tax-expressing T-cell lines expressed AID cytidine deaminase ((Fan et al., 2010; Ishikawa et al., 2011) and Supplementary Fig. S2),

AID is expressed in leukemic T cells from HTLV-1-infected HHLS mice.

We have previously demonstrated that human hemato-lymphoid system (HHLS) Balb/c-Rag2^{-/-}γc^{-/-} (BRG) mice developed lymphoproliferative disorders such as

hepatosplenomegaly, lymphadenopathy and lymphoma/thymoma, 3 to 4 months after HTLV-1 infection (Villaudy et al., 2011). To definitively determine whether AID is induced within human T cells following *in vivo* HTLV-1 infection we analysed AID expression in HTLV-1-infected HHLS-BRG mice. Expression of Tax, AID but also Bcl-2 and Bfl-1 was assessed by RT-qPCR within splenic cells obtained from 3 uninfected- and 3 HTLV-1-infected-mice that developed splenic lymphoma. We observed that HTLV-1-infected HHLS-BRG, but not uninfected-mice expressed a high level of both *tax* and *aicda* mRNA (Fig. 1c). As shown for *in vitro*-infected primary CD4⁺ T cells (Fig. 1a,b), HTLV-1 infection up-regulated Bfl-1 but not Bcl-2 expression. Importantly, immunohistochemical analyses clearly demonstrated that leukemic T cells express AID. Spleens from HTLV-1-infected mice showed a disorganized architecture with a strong infiltration of atypical large and multinucleated CD3 positive cells that stained for AID, while AID labelling was restricted to few CD20 positive B cells from germinal centres in spleens from uninfected mice (Supplementary Fig. S3). Reinforcing observations made in HTLV-1-infected HHLS-BRG mice, we further demonstrated that HTLV-1-infection of HHLS-NOD-Scid $\gamma\text{C}^{-/-}$ (NSG) mice led to *aicda* mRNA expression in Tax positive-human CD4⁺ splenic T cells isolated from infected mice (Fig. 1d).

HTLV-1-infected T cells expressed functional AID.

To assess endogenous functional activity of AID within HTLV-1-infected T cells, we used a fluorescence-based DNA C-to-U assay (Thielen et al., 2007). For that purpose 19-mer substrates containing either a consensus site for AID (AGCT) or a control sequence (ATTT), were incubated in the presence of cell lysates prepared from cells expressing AID or not. To validate the assay we first measured DNA

editing activity in cell lysates from Raji Burkitt's lymphoma cell line that express high level of AID. As expected Raji cell lysates contained a strong DNA editing activity towards AID, but not towards a control consensus sequence. Such DNA editing activity was very efficiently repressed following AID knockdown by Sh-RNA but remained unchanged in control Sh-RNA expressing cells (Fig. 2a). We then performed the experiment using lysates from HTLV-1 infected T cells. As for Raji cell line, a strong AID-specific DNA-editing activity was present in lysates from the HTLV-1⁺ MT2 cell line that highly expressed AID (Fig. 2b and Supplementary Fig. S2). Importantly, we demonstrated that 3 Tax-positive T cell clones isolated from spleens of HTLV-1 infected HHLS-NSG mice or in vitro infected primary CD4⁺ T cells also possessed a significant AID-specific DNA-editing activity while primary CD4⁺ T cells isolated from healthy control showed no cytidine deaminase activity (Fig. 2c,d). Altogether these results indicate that HTLV-1-infected T cells expressed a functional AID cytidine deaminase activity.

AID leads to DNA damages in Tax-expressing T cell lines.

Through its cytidine deaminase activity AID plays a key role in genomic instability. We thus asked whether AID contributes to the accumulation of DNA damages within T cells in the context of HTLV-1 infection. We first confirmed that Tax viral protein by itself was sufficient to induce a strong AID expression within T cell lines (Ishikawa et al., 2011). To this end, Molt4 T cells were transduced with either empty pSDM101 lentiviral vector or Tax-expressing pSDM101 lentiviral vector (Chevalier et al., 2012). Transduction efficiency, measured by GFP expression was reproducibly over 95% (Supplementary Fig. S4a). Tax expression was confirmed at both mRNA (Supplementary Fig. S4b) and protein levels (Fig. 3a). We observed a strong

expression of AID in Tax-expressing Molt4 T cells, while no AID expression was found in either in non-transduced cells or cells transduced with empty lentiviral vector (Fig. 3a). AID expression within Tax-expressing Molt4 T cells was associated with AID-specific DNA-editing activity in the corresponding cell lysates (Fig. 3b). No AID expression and activity were observed in Tax-transduced Molt4 T cells that stably expressed AID-specific Sh-RNA, while AID expression and activity were unchanged by control Sh-RNA expression (Fig. 3a,b). As a control we determined that AID specific Sh-RNA did not affect Tax, Bcl-2 and Bfl-1 expression (Fig. 3a for Tax and data not shown).

Induction of DNA damages, such as single and double strands DNA breaks, was then assessed by confocal microscopy following anti phospho- γ H2AX labelling in the different conditions. At 96h, following Tax transduction, we observed a high number of phospho- γ H2AX foci in Tax-expressing Molt-4 T cells. Those foci were absent in either non-transduced or Molt-4 T cells transduced with empty lentiviral (Fig. 4a,b and data not shown). Knockdown of AID led to a significant decrease of phospho- γ H2AX foci in Tax-expressing Molt-4 T cells, while control Sh-RNA did not decrease the appearance of DNA damages (Fig. 4a,b). Of note that AID knockdown did not affected DNA damages induced by etoposide a well-known inhibitor of topoisomerase II that induces double strand breaks (Montecucco and Biamonti, 2007) (Fig. 4a). These results were further confirmed using JPX-9 T cells, a Jurkat subclone that express the tax gene under the control of the inducible metallothionein gene promoter. Treatment of JPX-9 cells with 20mM of CdCl₂ led to the expression Tax protein at 48h and AID expression at 72h (Supplementary Fig. S5a). Concomitantly with AID protein expression, we observed accumulation of phospho- γ H2AX foci within CdCl₂-treated cells (Supplementary Fig. S5b). As observed for

Molt-4 cells, expression of AID-specific Sh-RNA but not Ctl-Sh-RNA strongly decreased the appearance of DNA damages in Tax expressing JPX-9 cells, while AID knockdown did not affected etoposide-mediated DNA damages in those cells. Altogether these results indicate for the first time that AID is directly involved in Tax-mediated DNA damages within T cells.

AID leads to DNA damages in HTLV-1-infected primary CD4 T cells

Then, we investigated induction of DNA damages in AID-expressing primary CD4⁺ T cells following their infection after co-culture with mitomycin-treated HTLV-1-producing MT2 cells. As for Tax-expressing T cell lines (Fig. 4 and Supplementary Fig. S5), we observed that AID expression in HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells was associated with a high number of phospho- γ H2AX foci throughout the nucleus in Tax⁺ cells compared to uninfected CD4 T cells. Phospho- γ H2AX labelling strongly decreased following AID knockdown by specific Sh-RNA but remained unmodified in control Sh-RNA expressing cells (Fig. 5a,b). The capacity of AID to induce single and/or double strands DNA breaks in HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells was further confirmed by comet assays a sensitive method for the detection of strand break damages. Indeed, quantification of comet tail moment indicated that DNA breaks were significantly reduced HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells expressing AID-specific but not control Sh-RNA (Fig. 5c,d).

These data indicated that AID is functional in HTLV-1-infected CD4⁺ T-cells and suggested that Tax-induced AID expression is involved in genomic instability of HTLV-1-infected CD4⁺ T-cells.

Discussion

Although the physiological function of AID within B lymphocytes is essential for diversification of the Ig repertoire and thus efficient adaptive immunity in mammals, it is now well admitted that AID can cause DNA base-pairing mismatches in non-Ig genes, including oncogenes or tumour suppressor genes, and that aberrant expression of AID is a cause of malignancy. First clues of a potential mutagen activity of AID within T cells, arise from the observation that the constitutive expression of AID within AID transgenic mice led to T cell lymphomas with frequent mutations in the V β sequences of expressed TCRs, but also in c-myc and Pim1 oncogenes. However no chromosomal translocations were observed in these T cell lymphomas (Kotani et al., 2005; Okazaki et al., 2003). Ectopic expression of AID was recently revealed in adult T-cell leukemia (ATL) cells and HTLV-1 infected T cell lines (Fan et al., 2010; Ishikawa et al., 2011), and it was demonstrated by Ishikawa and colleagues (Ishikawa et al., 2011) that Tax protein from HTLV-1 induces AID expression through both NF- κ B and CREB dependent signalling pathways within T cells, suggesting that AID could be involved in human T-cell malignancies.

Supporting a key role for AID in T-cell malignancies associated with HTLV-1 infection we demonstrated here that HTLV-1 infection is associated with an increased AID-specific DNA editing activity within human primary T cells and that AID is directly involved DNA damages induced following HTLV-1 infection or Tax overexpression in T cells. Relevance of these *in vitro* data is reinforced by the strong expression of AID protein in splenic T lymphoma from two HHLS murine models of HTLV-1 infection and within CD25⁺ leukemic T cells in lymph node and liver tissue from one ATL patient (Supplementary Fig. S6)

Accumulation of genetic aberrations in HTLV-1-infected cells is a crucial step for ATL development, and Tax-mediated DNA damage is believed to be essential in initiating the transformation process, although the precise role(s) of Tax in this process is(are) not yet fully understood. Many studies have shown that Tax can impair cell-cycle checkpoints and DNA repair mechanisms (Marriott and Semmes, 2005), thus favouring accumulation DNA breaks and mutations that could leads to transformation in a restricted number of cells. Tax was also reports to induce oxidative DNA lesions through reactive oxygen species (Kinjo et al., 2010 ; Takahashi et al., 2013) that could be source of mutations during DNA synthesis (Bruner et al., 2000). Our results clearly identified AID as a major actor of DNA damages and DNA strand breaks in the context of HTLV-1 infection. Using two complementary assays (phospho- γ H2AX labelling and COMET assay), we found that knockdown of AID significantly reduced DNA damages induced following Tax expression in Molt-4 and Jurkat T cell lines, but also in HTLV-1 infected CD4 T cells, thus demonstrating the direct implication of AID in Tax-mediated DNA damages.

Among the AID/APOBECs family, it recently emerges that APOBEC3 cytidine deaminases, which were first recognized as intrinsic antiviral factors through edition of viral single-strand DNA (Smith et al., 2012), can also be source of human genomic mutations or translocations. First APOBEC3A was found to edit single-strand mitochondrial and nuclear human DNA (Suspene et al., 2011) but also to induce double strand breaks DNA in primary CD4 T cells (Mussil et al., 2013). More recently APOBEC3B, was found overexpressed in several tumours (bladder, cervical, lung, head and neck and breast) and through whole-genome or exome sequencing approaches this overexpression was correlated with the presence of APOBEC3B mutation patterns (Burns et al., 2013a; Burns et al., 2013b; Roberts et al., 2013)

indicating that APOBEC3B may be a source of mutations in cancer. We thus carefully checked for APOBEC3A and 3B expression in our samples. We found no expression of APOBEC3A or 3B in Tax positive T cell lines and HTLV-1-infected primary CD4 T cells, while peripheral blood mononuclear cells and MDA-MB-468 breast cancer cell line used as positive controls expressed APOBEC3A and APOBEC3B respectively (Supplementary Fig. S7).

Although AID can be source of genomic instability and thus a cause of malignancy, two studies point out a potential role for AID in the immune surveillance of virally infected cells, and suggest a protective role for AID following infection with oncogenic viruses. First, Gourzi *et al.*, observed that AID-deficient mice are more susceptible to transforming Abelson murine leukemia virus (A-MuLV) that causes pro-B cell leukemia *in vivo*. Interestingly, the authors demonstrated that infection of murine pro-B cells by A-MuLV induces AID expression, leading to the overexpression of NKG2D ligands by infected B cells and their elimination by natural killer cells (Gourzi *et al.*, 2006). Similarly, an upregulation of AID and sensitization of infected cells to NK-mediated cell lysis was recently reported following infection of primary B cells by the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) (Bekerman *et al.*, 2013). Whether expression of AID might also stimulate the innate immune response against Tax-expressing T cells through the up-regulation of stress-inducible factors and thus limit transformation remain to be demonstrated. Indeed, together with the elimination of infected cells by Tax-specific cytotoxic T lymphocytes, one can speculate that stimulation of innate immune surveillance by Tax through the activation of AID may limit progression of pre-leukemic cells towards the ATL stage.

In conclusion our results provide the first evidence that AID is functionally expressed and induces DNA damages in HTLV-1-infected CD4⁺ T cells suggesting that it may

both favour the elimination of infected cells by the innate immune system but also contribute to the leukemogenic process by inducing mutations in the genome of HTLV-1 infected T cells.

METHODS

Cell lines. The HTLV-1-infected MT-2, MT-4, OSP2, C8166-45, SP, and FC36.22 T-cell lines were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. The HTLV-1-infected T-cell line C91PL was provided by E. Wattel (Lyon, France). Uninfected human leukemia Jurkat (Clone E6–1), Sup-T1, Molt-4 (Clone 8) and CEM, and lymphoma HuT-78 T-cell lines were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. JPX-9 cells are derivatives of Jurkat, which have a stably integrated *tax* gene under the control of a metallothionein promoter and are kindly provided by M. Nakamura (Tohoku University, Japan). To induce Tax expression, JPX-9 cells were cultured in the presence of 20 μ M CdCl₂. Stably Tax/HBZ-expressing Jurkat (E12 clone) T-cells were obtained as reported previously (Lemasson et al., 1997; Valentin et al., 1997). With the exception of FC36.22 and SP cells all T-cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% endotoxin-free FCS (Lonza), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, and 40 mg/ml gentamicin (Invitrogen). FC36.22 and SP cells were cultured in the presence of 200U/ml IL-2 (peprotech). The 293T cell line used for lentiviral production was obtained from ATCC and grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% endotoxin-free FCS (Lonza), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, and 40 mg/ml gentamicin (Invitrogen).

Human CD4⁺ T cells. Mononuclear cells were isolated by Ficoll-Paque density centrifugation of freshly collected umbilical cord blood (UCB). UCB was obtained from healthy full-term newborns with written parental informed consent according to the guidelines of the medical and ethical committees of Hospices Civils de Lyon and of Agence de Biomedecine, Paris, France. Experiments using cord blood were approved by both committees and were performed in full compliance with French law. Mononuclear cells were incubated at 37°C in complete RPMI medium and stimulated with PHA (5 µg/ml) during 48 h. Then, CD4⁺ T-cells were isolated by negative selection using the EasySep human CD4⁺ T-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's instructions. These cells were grown in complete RPMI medium supplemented with 1% (v/v) Eagle's minimum essential medium nonessential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, and 200 units/ml human IL-2 (PeproTech).

HTLV-1 infection of human hemato-lymphoid system (HHLS) mice. Animal experimentation was performed in strict accordance with the French "Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale, n° 15" and the ethical guidelines for the care of these mice of the Plateau de Biologie Experimentale de la Souris (PBES, UMS 3444) at Ecole Normale Supérieure de Lyon. The protocols used throughout that study have been approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Ecole Normale Supérieure de Lyon (Permit number: 0231). All efforts were made to minimize animal suffering. Isolation of human CD34⁺ cells from cord blood samples was performed as described earlier (Villaudy et al., 2011). Newborn (less than 3-day old) Balb/c-Rag2^{-/-}γc^{-/-} (BRG) or NOD-SCIDγc^{-/-} (NSG) mice were irradiated with 2Gy from a ¹³⁷Cs source (CIS BIO international, IBL637) and then were intrahepatically injected with human CD34⁺ cord blood cells (1.5-

2×10^5) in 30 μ l PBS. For weeks later, these mice develop a HHLS, as ascertained by the presence of hCD45⁺ cells in the thymus, the spleen, the bone marrow and the peripheral blood, as previously shown (Villaudy et al., 2011). HHLS BRG or NSG mice aged from 4 to 8 weeks were intraperitoneally injected with 2×10^6 lethally irradiated MT-2 cells in 100 μ l of PBS. Infection was performed in a Biosafety Level 3 laboratory in accordance with the PBES guidelines.

Lentiviral Particles Production. Ten centimeters plates were pre-coated with poly-L-lysine (Sigma) for 30 min before plating 4×10^6 of 293 T cells. The following day, cells were transfected with 4.68 μ g of psPAX-2 (Gag/Pol, Addgene), 2.52 μ g of pMD2.G (Env, Addgene) and 9 μ g of pSDM101-FLAG-TAX (LENTI-Flag-Tax1), or pSDM101- empty (LENTI-IRES-GFP) (2012_Chevalier_PLoSone_LentiTax) using LipoD293 reagent (Gentaur). Tax-1 cDNA was amplified from pSG5M-Tax-1. Seventy-two hours post-transfection, supernatants were collected, centrifuged for 5 min at 3,000 rpm then filtered through a 22- μ m filter (Millipore). Stocks of lentiviral particles were conserved at -80°C.

RNAi reagents and primer sequences for qPCR. Lentiviral vectors expressing specific shRNA were obtained from Sigma-Aldrich and the TRC IDs and sequences are: Control shRNA: MISSION TRC2 pLKO.5-puro Non-Mammalian shRNA Control SHCOO2V, 5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTT TTT-3'; AICDA shRNA: TRCN0000424739, 5'-CCGGAGCATGGTGAGAGGATCAAATCTC-GAGATTTGATCCTCTCACCATGCTTTTTTTTG-3'. Primers sequences for each gene are: AICDA_forward: 5'-AGAGGCGTGACAGTGCTACA-3'; AICDA_reverse: 5'-TG TAGCGGAGGAAGAGCAAT-3'; TAX_forward: 5'-

TGTTTGGAGACTGTGTACAAGG-CG-3';	TAX_reverse:	5'-
GTTGTATGAGTGATTGCCCCGGGTAA-3';	BFL-1_forward:	5'-
ACAGGCTGGCTCAGGACTATCT-3';	BFL-1_reverse:	5'-
CTCTGGACGTTGAGTCCGA-TTAC-3';	BCL-2_forward:	5'-
TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3';	BCL-2_reverse:	5'-
GTTTGGGGCAGGCATGTTGAC-3';	HPRT_forward:	5'-
ACCCGCAGCCCTGGCGTC-GTGATTA-3';	HPRT_reverse:	5'-
CCATCTCCTTCATCACATCTCGAGC-3';	APOBEC3A_forward:	5'-
GAGAAGGGACAAGCACATGG-3';	APOBEC3A_reverse:	5'-
TGGATCCATCAAGTGTCTGG-3';	APOBEC3B_forward:	5'-
GACCCTTTGGTCCTTCG-AC-3';	APOBEC3B_reverse:	5'-
GCACAGCCCCAGGAGAAG-3'.		

Transduction Assays. 2×10^5 cells were cultured in a 24-well plate for 24 h. The cells were then transduced with lentiviral vector expressing specific shRNA at a multiplicity of infection of 5 in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ of Polybrene (Sigma), as performed previously (Brien et al., 2007). 72 h later cells were cultured in a 6-well plate in presence of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of puromycin (Sigma). Then shRNA-expressing cells (1×10^6) were resuspended in 1 ml of lentiviral vector pSDM101 with 8 $\mu\text{g/ml}$ of polybren. Cells were centrifuged at room temperature for 1 h at 3,000 rpm. The medium was then changed and cells were plated on a 6-well plate.

RNA Extraction and Real Time RT-PCR. T cells ($0.5\text{--}2 \times 10^6$) were lysed according to the manufacturer's specifications (SV total RNA isolation kit, Promega). The real time RT-PCR was performed with FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science) on a StepOne Plus machine (Applied Biosystems) using 4 μM of each

primer. cDNA levels were normalized using the housekeeping *HPRT* gene. Each sample was run in triplicate.

Immunoblotting Analysis. Cells ($2\text{--}5 \times 10^6$) were lysed in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). Total protein extracts (50 μ g) were separated on a NuPAGE 4–12% BisTris gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen). Protein expression was analyzed by immunoblotting using the following specific Abs; mouse anti-Bcl-2 (clone 124, Dako SA) used at 1:1,000, mouse anti- β -actin (clone AC-15 Sigma) used at 1:1,000, anti-Tax hybridoma (168A51-42, obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program - Division of AIDS, NIAID, National Institutes of Health) used at 1:50, or rabbit anti-AID (30F12, Cell Signaling) used at 1:500, rabbit anti-GST-Bfl-1 (kindly provided by J. Borst, The Netherlands Cancer Institute) used at 1:1,000. Membranes were incubated with secondary antibodies (HRP-labelled goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. Protein-Ab complexes were visualized by chemiluminescence (Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus; PerkinElmer Life Sciences) on a LAS4000 machine (GE Healthcare).

Immunofluorescence. Cells (5×10^5) were treated with DRAQ5 (1:500 Biostatus) for 5 min, and then plated onto coverslips pre-coated with Poly-L-lysine (Sigma) in 24-well plate, fixed with 4% PFA solution (Sigma) for 20 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma) for 10 min. After 3 gentle washes cells were incubated with anti-phospho-S139 γ H2A.X rabbit polyclonal antibodies (Abcam) diluted at 1:500 and anti-Tax hybridoma (168A51-42) diluted at 1:50 in 5%PBS/SVF for 2 h at room

temperature. Cells were then incubated with Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG and Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (Life Technologies). Confocal analysis was performed on a Carl zeiss LSM 710 confocal.

Cytidine deaminase assay. Cellular fractionation of 5×10^6 cells was performed using a Dounce homogenizer fitted with a B pestle in 4 packed cell pellet volumes of hypotonic buffer (20mM Tris-HCL pH 7.4, 10mM NaCl, 1.5mM MgCl₂) for 10 min on ice. Nuclei were lysed in a one-packed nuclear pellet volume of a high salt buffer (20mM Tris-HCL pH 7.4, 720mM NaCl, 25% Glycerol, 0.2mM EDTA, 1.5mM MgCl₂ supplemented with protease inhibitor mixture) for 30 min. The suspension was centrifuged at 13,000g for 30 min at 4°C and the supernatant dialyzed against 100 volumes of buffer BC100 (20mM Tris-HCL pH 7.4, 100mM NaCl, 10% Glycerol, 0.2mM EDTA, 1.5mM MgCl₂) for 6 h. The dialysate (nuclear extract) was cleared by centrifugation at 13,000g for 30 min. Lysate were incubated 2 h at 37°C with DNA oligonucleotide either containing the hotspot of AID: 5' – (6-FAM) – ATTAAGTTA**AGCTAGCT**AAGTTAT – (TAMRA) – 3' or with control sequence: 5' – (6-FAM) – ATTAAGTTA**ATTTATTTA**AAGTTAT – (TAMRA) – 3' and Uracil DNA Glycosylase (2U/ml). Fluorescence of 6-FAM was measured in triplicate on a luminometer (Infinite M200, Tecan) after excitation at 460 nm at 4°C to avoid any background.

Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. Comet assay was performed according to the manufacturer's specifications (Trevigen #4250-050-k) with few modifications as described previously (Tuduri et al., 2009) in order to detect double- and single-stranded breaks. Cells used as positive control were treated for 1 h with 1.5 µg/ml etoposide. Analysis was carried out using the Comet Imager Software V 2.0.105 (Metasystem, Germany). Tail moment (TM) considers both the

tail length (TL) and the fraction of DNA in the comet tail ($TM = \%DNA \text{ in tail} \times TL/100$). A total of 100 cells were analysed per slide.

Tissues selection, morphologic analysis and immunophenotyping studies.

Buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from spleen of either uninfected or HTLV-1-infected HHLS-BRG mice were used for histological and immunohistochemical studies. For further investigations we included a patient with Adult T-cell leukemia-lymphoma due to HTLV-1, who was previously diagnosed in the Department of Biopathology CHU Montpellier. Moreover, we obtained samples of reactive lymphoid hyperplasia of lymph node for AID immunohistochemical control specimens.

Morphological features were assessed on hematoxylin-eosin (HE) stained histological sections of spleens from uninfected and HTLV-1-infected mice. Surgically resected lymph node and liver biopsy specimens of the patient with the diagnosis of Adult T-cell leukemia-lymphoma due to HTLV-1, were respectively stained with HE and Giemsa. Lymphoid neoplasm was classified according to the WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008. The case was reviewed by at least two pathologists. Immunohistochemistry was carried out using an indirect immunoperoxidase method on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE tissues). Four- μ m-thick tissue sections were cut from the paraffin-embedded blocks. Immunostaining was performed using a Ventana Benchmark XT Autostainer (Ventana, Tucson, AZ, USA). The following markers were used after appropriate antigen retrieval: CD20 (clone L26, mouse monoclonal antibody, Dako, Denmark A/S, 1:300), CD3 (clone F7.2.38, mouse monoclonal antibody, Dako, Denmark A/S, 1:20), CD25 (clone 4C9, mouse monoclonal antibody, Leica Microsystems,

Newcastle upon Tyne, United Kingdom, 1:200) and AID (clone, Invitrogen, Zymed, South San Francisco, CA, USA, 1:100). All other reagents were obtained from Ventana. For the evaluation of AID staining, cases were considered positive if the malignant cells demonstrated cytoplasmic staining, according to positive control specimens (reactive lymphoid hyperplasia of lymph node).

Figure legends

Figure 1: AID is expressed in HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells. **a**, mRNA expression of *tax*, *aicda*, *bcl-2* and *bcl2-a1* were measured by real-time RT-qPCR in human primary CD4⁺ T cells infected (+) or not (-) by co-culture with HTLV-1-producing mitomycin-treated MT-2 cells (n=3). Results are expressed as relative expression normalized with the HPRT gene. The means $\pm$ SEM are shown. **b**, Tax, AID, Bcl-2 and Bfl-1 protein expression were analyzed by Western Blot in human primary CD4⁺ T cells infected (+) or not (-) by co-culture with mitomycin-treated MT-2 cells. Expression of β -actin was used as loading control. **c**, *tax*, *aicda*, *bcl-2* et *bcl2-a1* human mRNA were measured by real time RT-qPCR in splenocytes from uninfected (n=3) or HTLV-1-infected (n=3) HHLS BRG mice. Results are expressed as relative expression normalized with the HPRT gene. The means $\pm$ SEM are shown. **d**, *tax*, *aicda*, *bcl-2* et *bcl2-a1* human mRNA were measured by real time RT-qPCR in human CD4⁺ T cells purified and amplified in the presence of IL-2 (200U/ml) (uninfected) or CD4⁺ T cell clones amplified from spleens of HTLV-1-infected HHLS NSG mice (HTLV-1⁺). The results are expressed as relative expression normalized with the HPRT gene. The mean $\pm$ SEM of 5 samples of uninfected CD4 T cells and 5 samples from HTLV-1-infected mice are shown.

Figure 2: AID is functional in HTLV-1-infected T cells. C-to-U deaminase activity of nuclear extracts from cells expressing or not AID was measured by FRET-based assay using 19 mer oligonucleotides flanked by 5'-6-FAM and 3'-TAMRA containing the hotspot sequence of AID (AGCT, black symbol), or a control sequence (ATTT, white symbol). The results are expressed as Relative Fluorescence Units (RFU). AID cytidine deaminase activity was measured in nuclear extracts from **a**, Raji B cells non-transduced (Mock) or transduced with control (shCtl) or AID specific (shAID) shRNA **b**, HTLV-1-infected MT-2 cells and uninfected Jurkat T cell line **c**, uninfected primary CD4⁺ T cells (CD4) and CD4⁺ T cells isolated from HTLV-1-infected HHLS NSG mice (#106, 112, 746, 792 and 831) **d**, human primary CD4⁺ T cells infected (CD4 HTLV-1+) or not (CD4 HTLV-1-) by co-culture with HTLV-1-producing mitomycin-treated MT-2 cells. The means $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments performed in triplicates are shown.

Figure 3: Tax induces AID-dependent cytidine deaminase activity in Molt-4 T cell line. **a**, Tax and AID protein expression were analyzed by Western Blot in Molt-4 T expressing or not control (shCtl) or AID specific (shAID) shRNA and non-transduced (NT) or transduced with pSDM101-flag-ctl (Ctl) or pSDM101-flag-Tax1 (Tax) vectors. MT-2 and Jurkat lysates were respectively used as positive and negative control for Tax and AID expression. Expression of β -actin was used as loading control. **b**, AID cytidine deaminase activity was measured in non-transduced Molt-4 T cells (Med) or Molt-4 T cells transduced with pSDM101-flag-Tax (Tax) and expressing either control (shCtl-Tax) or AID specific (shAID-Tax) shRNA. The means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicates are shown.

Figure 4: Tax induces AID-dependent DNA damages in Molt-4 T cell line **a**, Molt-4 T cells expressing or not (Med) control (shCtl) or AID specific (shAID) shRNA were either non-transduced (NT) or transduced with pSDM101-flag-Tax1 (Tax) vector or treated with etoposide (0.75µg/ml, 12h, Etoposide). DNA damages were detected by confocal microscopy following P γ H2A,X labeling (red), Tax expression was validated by staining with Tax specific antibody (green) and nuclei were stained with DRAQ5 (blue). Images are representative of at least 3 independent experiments. **b**, Quantification of the percentage of P γ H2A,X positive cells by counting 200 nuclei in each condition.

Figure 5: HTLV-1 induces AID-dependent DNA damages in primary CD4 T cells. **a**, Human primary CD4 T cells either unmodified (Med) or expressing control (shCtl) or AID specific (shAID) shRNA were infected (HTLV-1+) or not (HTLV-1-) by co-culture with mitomycin-treated MT-2 cells. DNA damages were detected by confocal microscopy following P γ H2A,X labeling (red), Tax expression was validated by a staining with Tax specific antibody (green) and nuclei were stained with DRAQ5 (blue). Images are representative of 3 independent experiments. **b**, Quantification of the percentage of P γ H2A,X positive cells by counting 200 nuclei of each condition. **c and d**, Presence of single and double strand breaks was analyzed using Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. **c**, Representative images of DDSB observed in non-infected (HTLV-1-) or HTLV-1-infected (HTLV-1+) primary CD4+ T cells expressing control (shCtl) or AID specific (shAID) shRNA or not (Med) . **d**, Tail moment was calculated as described in the Methods section. Vertical lines represent median with 95% of confidence interval. White symbol represent outliers. Tail

moment distribution between each group were analyzed with a Mann Whitney test (NS not significant)

Figure S1: Control of potential contaminating MT-2 cells in HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells. CD3-CD4 staining was performed on MT-2 (left panel) CD4⁺ T cells (middle panel) and CD4⁺ T cells co-cultured with MT-2 for 7 days (right panel) and analyzed on a BD Biosciences LSRFortessa.

Figure S2: AID transcripts and protein are expressed in HTLV-1-infected and Tax-expressing T cell lines. **a**, Expression of AID mRNA (*aicda*) was measured by real-time RT-qPCR in uninfected (Jurkat, CEM, Molt-4, HuT-78 and Sup-T1) HTLV-1-infected (MT-4, OSP2, MT-2, SP, HuT-102, C91PL and FC36.22) and Tax-expressing (E12 and C8166) T-cell lines. Results are expressed as relative expression normalized with the HPRT gene. The mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments are shown. **b**, AID protein expression was analyzed by Western Blot in uninfected and HTLV-1-infected and Tax-expressing T-cell lines. Expression of β -actin was used as loading control.

Figure S3: Pathological features of spleens from uninfected and HTLV1-infected mice. (a) HE staining of a spleen from uninfected mice (x4 magnification). B cells form follicular structures (b) CD3 immunostaining of a spleen from uninfected mice (x4 magnification). Normal T cells are observed in interfollicular zone. (c) CD20 immunostaining of a spleen from uninfected mice (x4 magnification) showing normal B cells in follicular structures. (d) AID staining of a spleen from uninfected mice (x4 magnification, x40 magnification for the insert). Labeling is restricted to few

CD20 B cells from follicular structure. (e) HE staining of HTLV-1-infected mice (x20 magnification). Spleen architecture is disorganized by a diffuse infiltrate of atypical T cells without follicular structures. (f) CD3 immunostaining of a spleen from HTLV1-infected mice (x20 magnification). Note the diffuse infiltrate of atypical large T cells. (j) CD20 immunostaining of a spleen from HTLV1-infected mice's spleen (x20 magnification). There were few CD20 positive cells. (h) AID immunostaining of a spleen from HTLV1-infected mice's spleen (x20 magnification, x40 magnification for the insert). Diffuse atypical T cells infiltrate is positive for AID.

Figure S4: AID transcripts are expressed in Molt-4 transduced with Tax-expressing vector. **a**, GFP expression in Molt-4 cells either non-transduced (NT) or transduced with pSDM101-flag-ctl (Ctl) or pSDM101-flag-Tax1 (Tax) vectors was assessed by flow cytometry on a ACCURI C6 machine. **b**, *tax*, *aicda*, *bcl-2* et *bcl2-a1* human mRNA were measured by real time RT-qPCR in Molt-4 cells either non-transduced (NT) or transduced with pSDM101-flag-ctl (Ctl) or pSDM101-flag-Tax1 (Tax) vectors. The mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments are shown.

Figure S5: Tax induces AID-dependent DNA damages in JPX-9 T cell line. **a**, JPX-9 cells were transduced or not with control (+ShCtl) or AID specific (+ShAID) shRNA and non-treated (NT) or treated with 20 μ M CdCl₂ for 72h (CdCl₂-72h) or etoposide (0.75 μ g/ml) for 12h (Etoposide). DNA damages were detected by confocal microscopy following P γ H2A,X labeling (red), Tax expression was validated by a staining with Tax specific antibody (green) and nuclei were stained with DRAQ5 (blue). Images are representative of 3 independent experiments. **b**, Tax and AID protein expression were analyzed by Western Blot in JPX-9 cells transduced or not

with control (+ShCtl) or AID specific (+ShAID) shRNA and non-treated (NT) or treated with 20 μ M CdCl₂ for 48h or 72h. Expression of β -actin was used as loading control.

Figure S6: Pathological features of lymph node and liver tissue from one ATL patient. In HE sections of the lymph node **a**, there is a complete architectural effacement by a diffuse lymphoid proliferation of medium size to large atypical cells. Atypical lymphocytes are CD3-positive **b**, and CD25-positive **c**,. AID was diffusely expressed by atypical T cells. Atypical T cells were also observed in liver biopsy of the ATL patient as demonstrated with CD25 labeling tumoral T cells in a nodular pattern or in sinusoid **d**,. The atypical T cells were also positive for AID **f**,. Magnification factors are x40 for panels a, b, c and d and x20 for panels e and f.

Figure S7: APOBEC3a and 3b mRNA expression. *apobec3a* and *3b* human mRNA were measured by real time RT-PCR in human primary CD4⁺ T cells infected (+) or not (-) by co-culture with HTLV-1-producing mitomycin-treated MT-2 cells, in Molt-4 cells either non-transduced (NT) or transduced with pSDM101-flag-Tax1 (Tax) vector and in JPX-9 cells non-treated (NT) or treated with 20 μ M CdCl₂ for 72h (CdCl₂). Results are expressed as relative expression normalized with the HPRT gene. PBMC and MDA-MB-468 were used as positive control for *apobec3a* and *3b* respectively.

- Afonso, P.V., Zamborlini, A., Saib, A., and Mahieux, R. (2007). Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology* 4, 27.
- Baydoun, H.H., Bai, X.T., Shelton, S., and Nicot, C. (2012). HTLV-I tax increases genetic instability by inducing DNA double strand breaks during DNA replication and switching repair to NHEJ. *PLoS One* 7, e42226.
- Bekerman, E., Jeon, D., Ardolino, M., and Coscoy, L. (2013). A role for host activation-induced cytidine deaminase in innate immune defense against KSHV. *PLoS pathogens* 9, e1003748.
- Brien, G., Trescol-Biemont, M.C., and Bonnefoy-Berard, N. (2007). Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene* 26, 5828-5832.
- Bruner, S.D., Norman, D.P., and Verdine, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403, 859-866.
- Burns, M.B., Lackey, L., Carpenter, M.A., Rathore, A., Land, A.M., Leonard, B., Refsland, E.W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J.B., *et al.* (2013a). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 494, 366-370.
- Burns, M.B., Temiz, N.A., and Harris, R.S. (2013b). Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* 45, 977-983.
- Chandhasin, C., Ducu, R.I., Berkovich, E., Kastan, M.B., and Marriott, S.J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *Journal of virology* 82, 6952-6961.
- Chevalier, S.A., Durand, S., Dasgupta, A., Radonovich, M., Cimorelli, A., Brady, J.N., Mahieux, R., and Pise-Masison, C.A. (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.
- Conticello, S.G. (2008). The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol* 9, 229.
- Dayaram, T., Lemoine, F.J., Donehower, L.A., and Marriott, S.J. (2013). Activation of WIP1 phosphatase by HTLV-1 Tax mitigates the cellular response to DNA damage. *PLoS One* 8, e55989.
- Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* 416, 1-8.
- Endo, Y., Marusawa, H., and Chiba, T. (2011). Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J Gastroenterol* 46 Suppl 1, 6-10.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* 26, 5587-5595.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kou, T., Nakase, H., Fujii, S., Fujimori, T., Kinoshita, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 135, 889-898, 898 e881-883.

Fan, J., Ma, G., Nosaka, K., Tanabe, J., Satou, Y., Koito, A., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., and Matsuoka, M. (2010). APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *Journal of virology* 84, 7278-7287.

Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2006). A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* 24, 779-786.

Ishikawa, C., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M., and Mori, N. (2011). Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* 32, 110-119.

Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M.A., Okamura, N., Huang, Y., and Ohtani, K. (2008). Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* 27, 5635-5642.

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., and Mori, N. (2005). Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer* 115, 967-974.

Kim, Y.M., Geiger, T.R., Egan, D.I., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 29, 2142-2152.

Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.M., Jr., and Jeang, K.T. (2010). Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *Journal of virology* 84, 5431-5437.

Komori, J., Marusawa, H., Machimoto, T., Endo, Y., Kinoshita, K., Kou, T., Haga, H., Ikai, I., Uemoto, S., and Chiba, T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47, 888-896.

Kotani, A., Okazaki, I.M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Begum, N.A., Nakajima, T., Saito, H., and Honjo, T. (2005). A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4506-4511.

Kou, T., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Okazaki, I.M., Ueda, Y., Kodama, Y., Haga, H., Ikai, I., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 120, 469-476.

Lemasson, I., Robert-Hebmann, V., Hamaia, S., Duc Dodon, M., Gazzolo, L., and Devaux, C. (1997). Transrepression of lck gene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40tax. *Journal of virology* 71, 1975-1983.

Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.

Macaire, H., Riquet, A., Moncollin, V., Biemont-Trescol, M.C., Duc Dodon, M., Hermine, O., Debaud, A.L., Mahieux, R., Mesnard, J.M., Pierre, M., *et al.* (2012). Tax protein-induced

expression of antiapoptotic Bfl-1 protein contributes to survival of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T-cells. *J Biol Chem* 287, 21357-21370.

Marriott, S.J., Lemoine, F.J., and Jeang, K.T. (2002). Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. *J Biomed Sci* 9, 292-298.

Marriott, S.J., and Semmes, O.J. (2005). Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 24, 5986-5995.

Marusawa, H., and Chiba, T. (2010). Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol* 22, 442-447.

Marusawa, H., Takai, A., and Chiba, T. (2011). Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Adv Immunol* 111, 109-141.

Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 13, 470-476.

Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Niwa, Y., Sakai, Y., and Chiba, T. (2010). Up-regulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer. *Gastroenterology* 139, 1984-1994.

Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* 30, 1379-1389.

Montecucco, A., and Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 252, 9-18.

Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and 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.

Morisawa, T., Marusawa, H., Ueda, Y., Iwai, A., Okazaki, I.M., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 123, 2735-2740.

Morita, S., Matsumoto, Y., Okuyama, S., Ono, K., Kitamura, Y., Tomori, A., Oyama, T., Amano, Y., Kinoshita, Y., Chiba, T., and Marusawa, H. (2011). Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 32, 1706-1712.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.

Mussil, B., Suspene, R., Aynaud, M.M., Gauthier, A., Vartanian, J.P., and Wain-Hobson, S. (2013). Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death. *PLoS One* 8, e73641.

- Okazaki, I.M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2003). Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197, 1173-1181.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., 3rd, Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-112.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., *et al.* (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440, 105-109.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431-438.
- Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nature immunology* 4, 452-456.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028-1038.
- Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., *et al.* (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell* 36, 631-641.
- Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., *et al.* (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 45, 970-976.
- Rossi, D., Berra, E., Cerri, M., Deambrogi, C., Barbieri, C., Franceschetti, S., Lunghi, M., Conconi, A., Paulli, M., Matolcsy, A., *et al.* (2006). Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 91, 1405-1409.
- Shimizu, T., Marusawa, H., Endo, Y., and Chiba, T. (2012). Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. *Cancer Sci* 103, 1201-1206.
- Smith, H.C., Bennett, R.P., Kizilyer, A., McDougall, W.M., and Prohaska, K.M. (2012). Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol* 23, 258-268.
- Staszewski, O., Baker, R.E., Ucher, A.J., Martier, R., Stavnezer, J., and Guikema, J.E. (2011). Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Mol Cell* 41, 232-242.
- Suspene, R., Aynaud, M.M., Guetard, D., Henry, M., Eckhoff, G., Marchio, A., Pineau, P., Dejean, A., Vartanian, J.P., and Wain-Hobson, S. (2011). Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4858-4863.

- Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G.N., Matsuki, H., Yoshita, M., Tanaka, Y., and Fujii, M. (2013). HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood* 122, 715-725.
- Takai, A., Marusawa, H., Minaki, Y., Watanabe, T., Nakase, H., Kinoshita, K., Tsujimoto, G., and Chiba, T. (2011). Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation. *Oncogene*.
- Thielen, B.K., Klein, K.C., Walker, L.W., Rieck, M., Buckner, J.H., Tomblinson, G.W., and Lingappa, J.R. (2007). T cells contain an RNase-insensitive inhibitor of APOBEC3G deaminase activity. *PLoS pathogens* 3, 1320-1334.
- Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., *et al.* (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature cell biology* 11, 1315-1324.
- Valentin, H., Lemasson, I., Hamaia, S., Casse, H., Konig, S., Devaux, C., and Gazzolo, L. (1997). Transcriptional activation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene in T lymphocytes expressing human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Journal of virology* 71, 8522-8530.
- Villaudy, J., Wencker, M., Gadot, N., Gillet, N.A., Scoazec, J.Y., Gazzolo, L., Manz, M.G., Bangham, C.R., and Dodon, M.D. (2011). HTLV-1 propels thymic human T cell development in "human immune system" Rag2/ gamma c/ mice. *PLoS pathogens* 7, e1002231.
- Waldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B.R., and Grassmann, R. (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* 107, 4491-4499.
- Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H.W., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., and Casellas, R. (2011). Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nature immunology* 12, 62-69.
- Zan, H., Zhang, J., Ardeshtna, S., Xu, Z., Park, S.R., and Casali, P. (2009). Lupus-prone MRL/fas^{lpr}/lpr mice display increased AID expression and extensive DNA lesions, comprising deletions and insertions, in the immunoglobulin locus: concurrent upregulation of somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Autoimmunity* 42, 89-103.

Figures

Figure 1

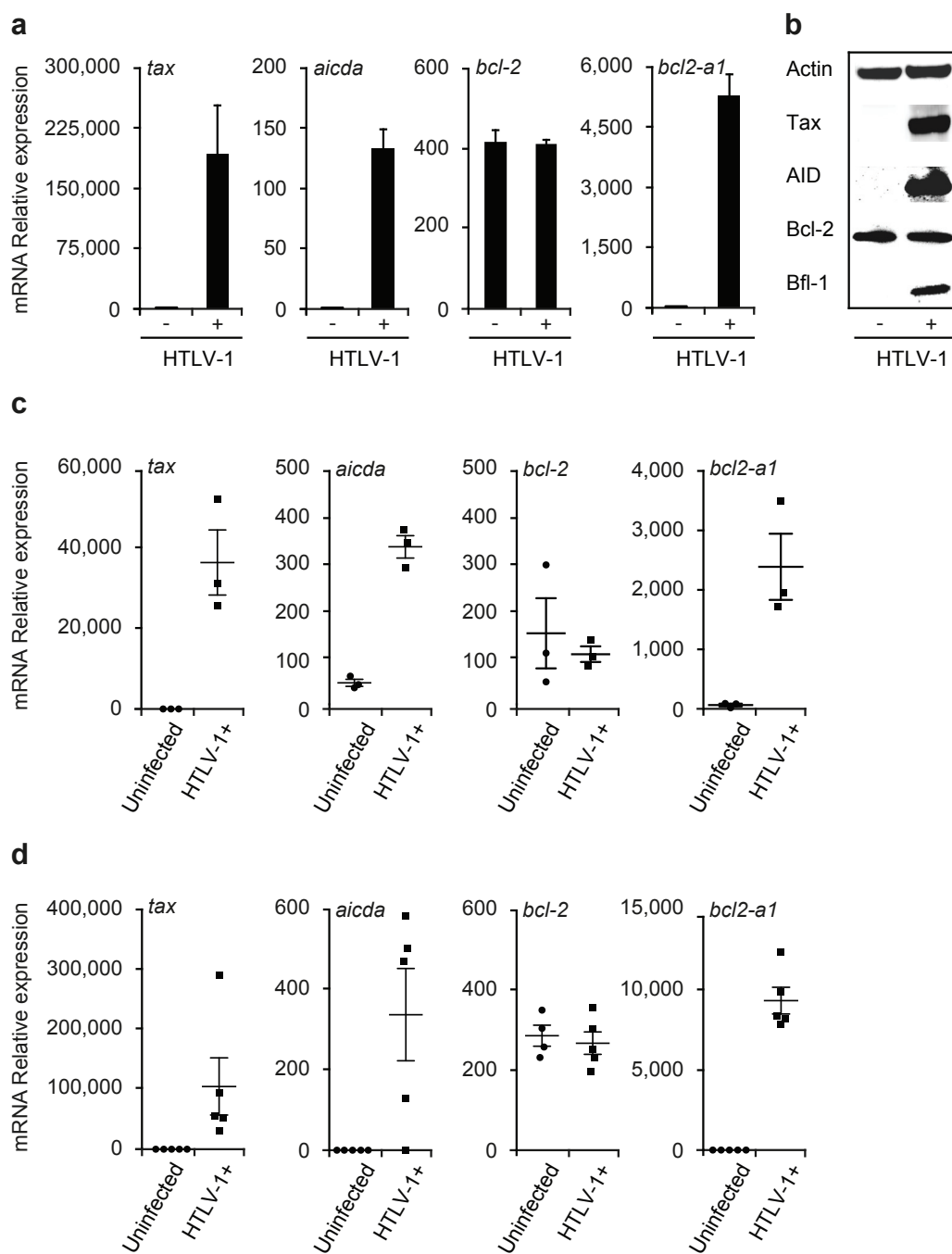


Figure 2

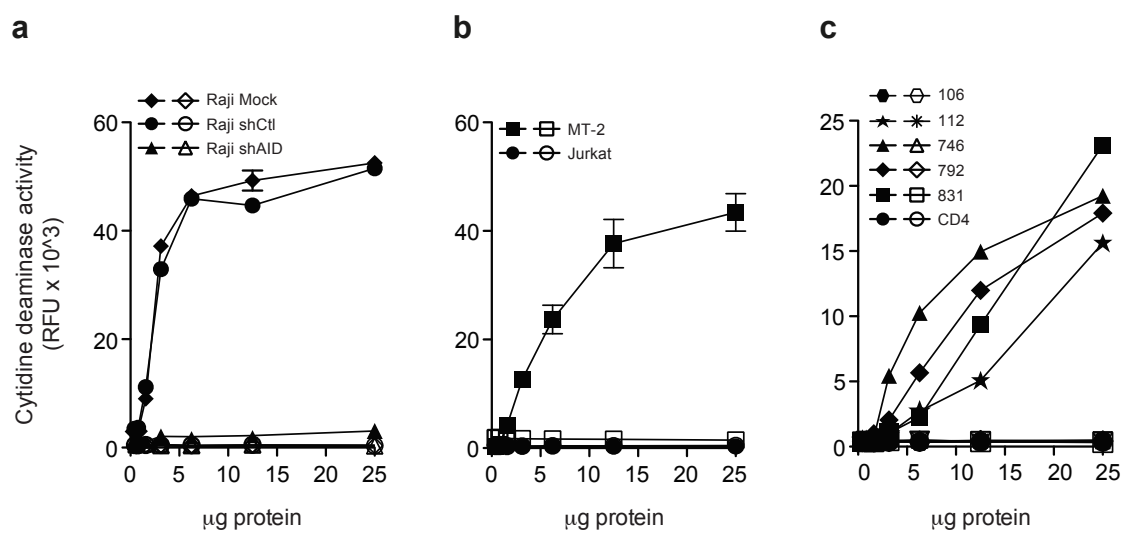


Figure 3

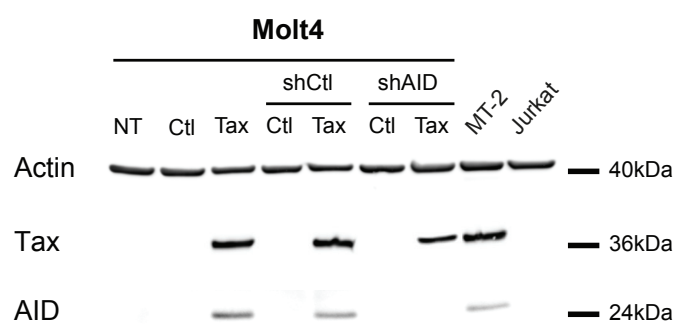
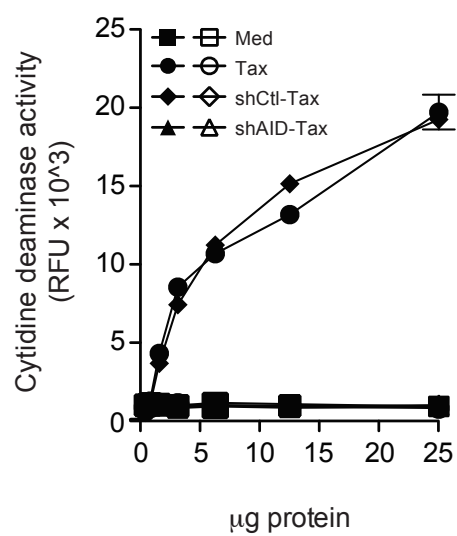
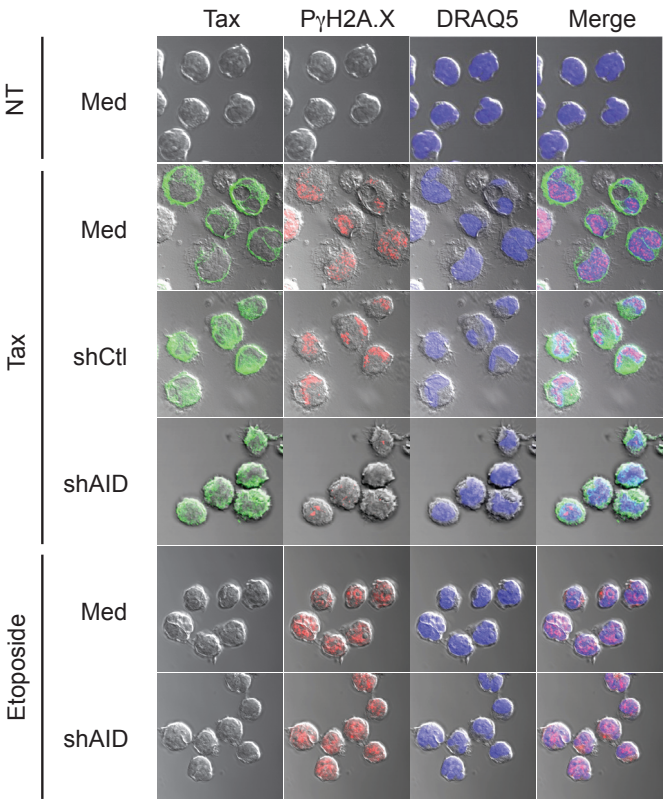
a**b**

Figure 4

a



b

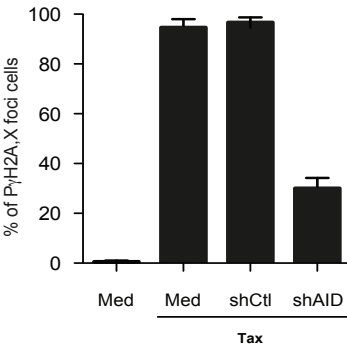


Figure 5

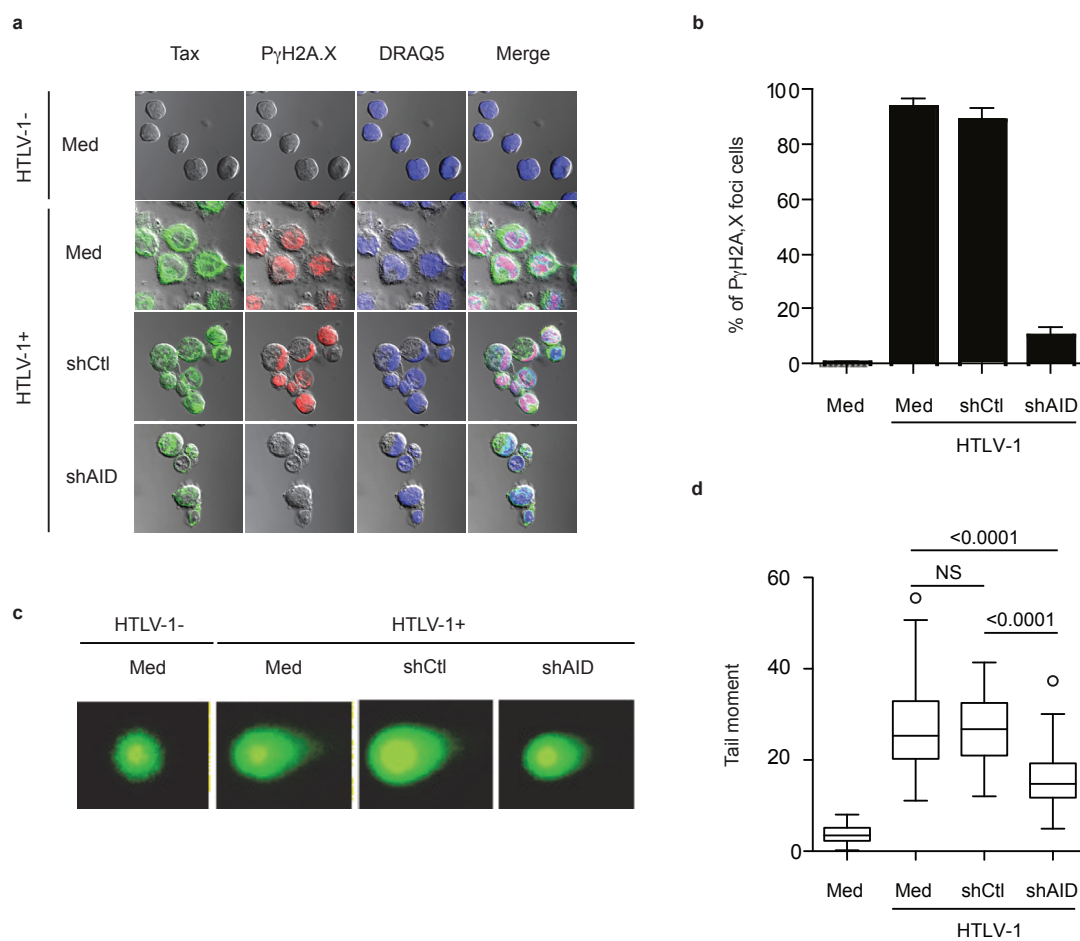


Figure S1

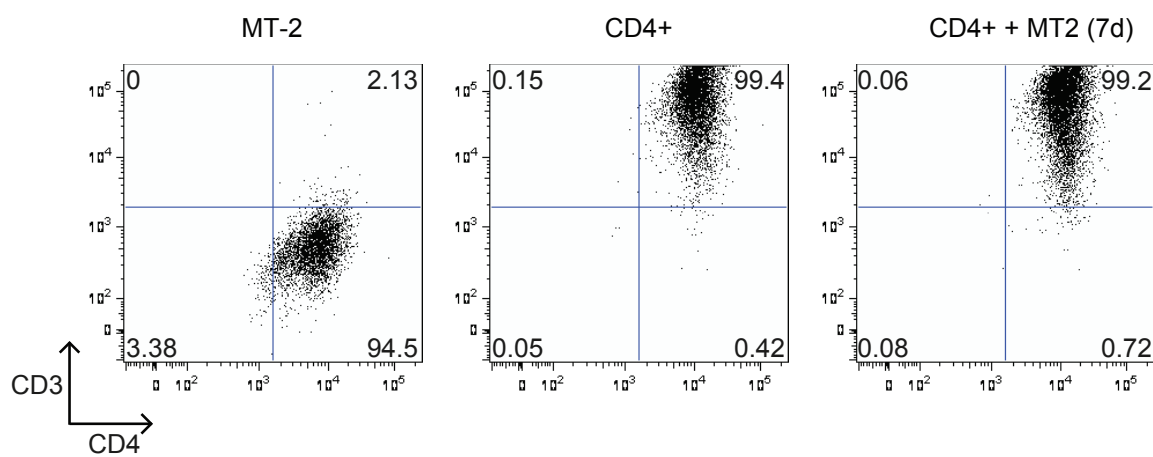


Figure S2

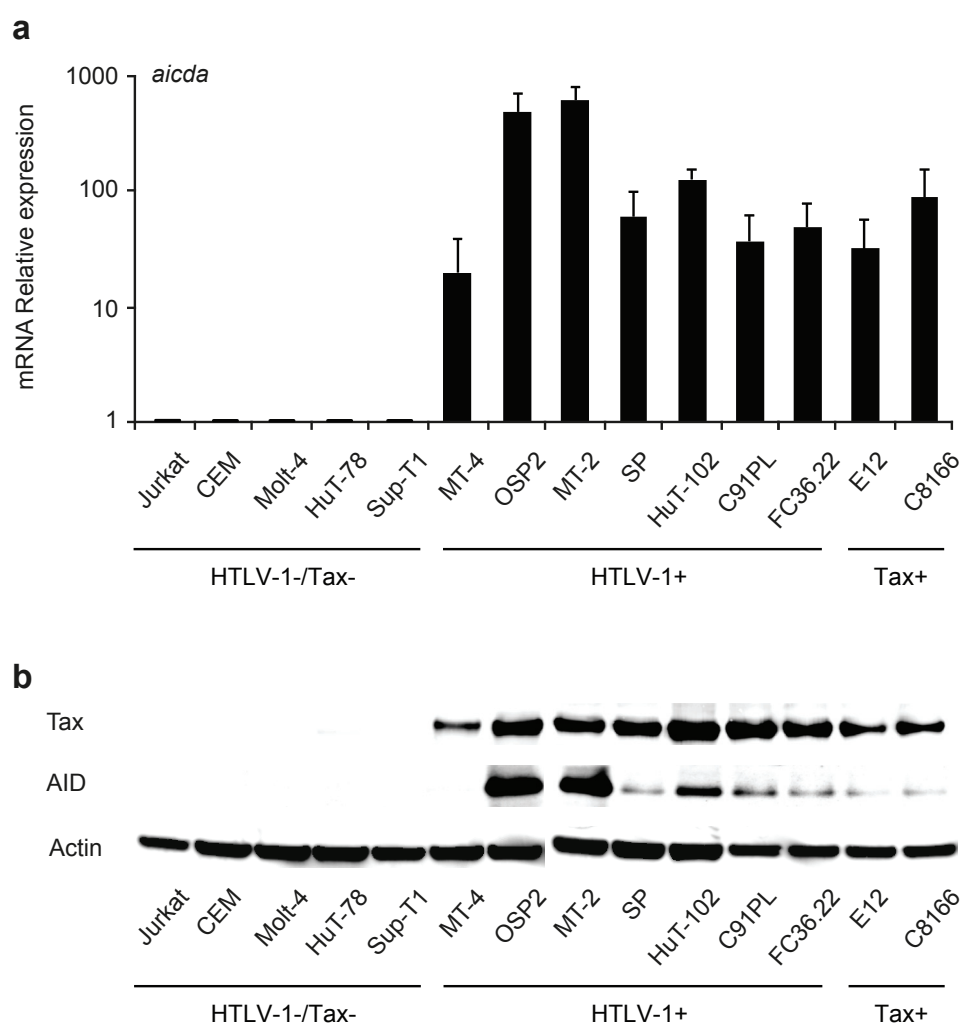


Figure S3

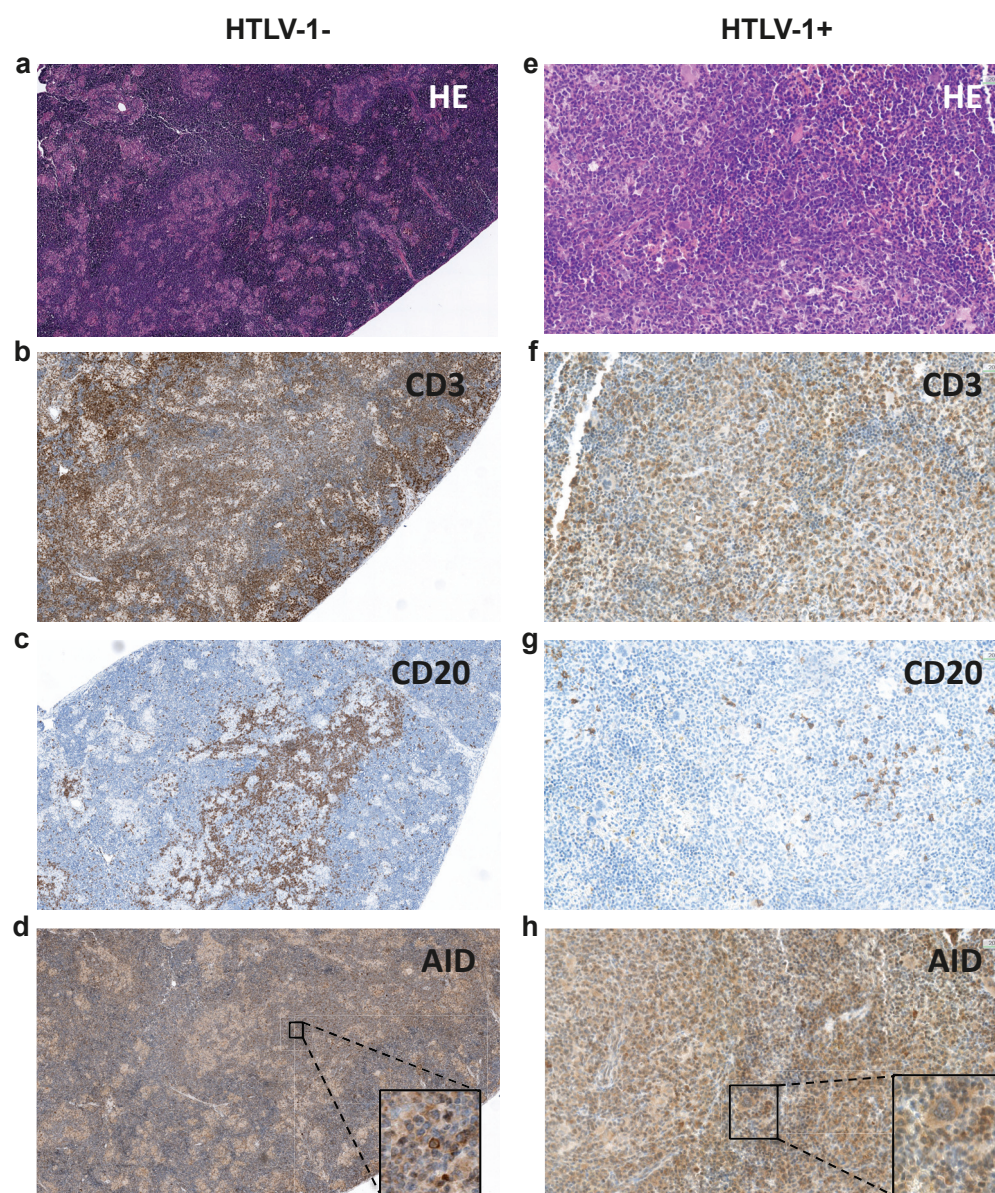


Figure S4

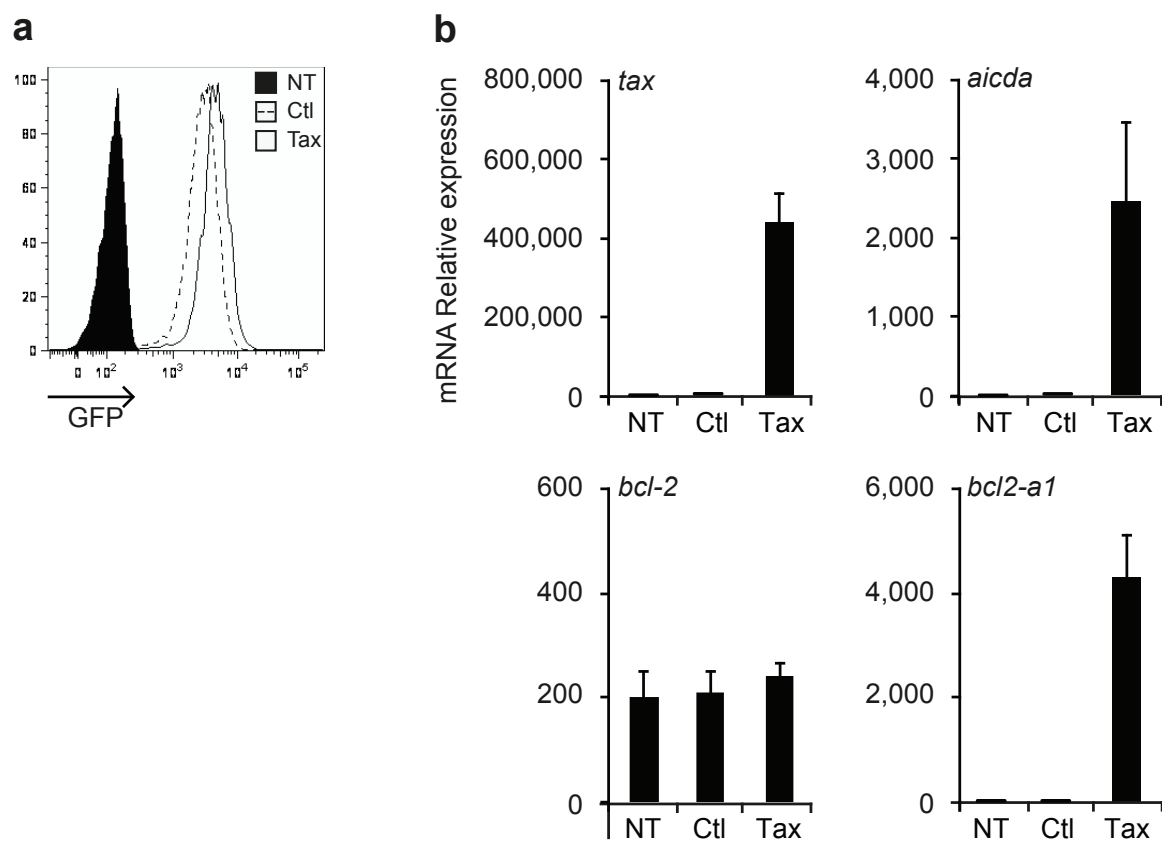
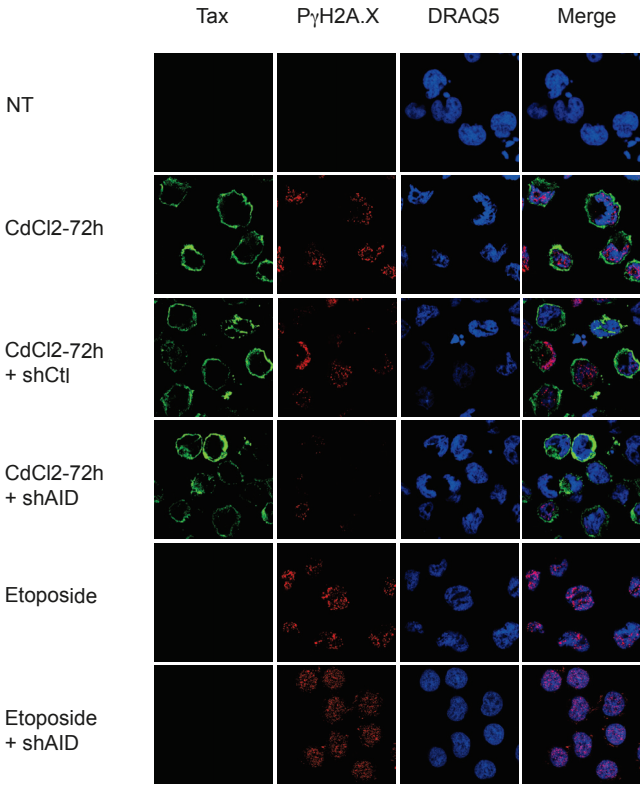


Figure S5

a



b

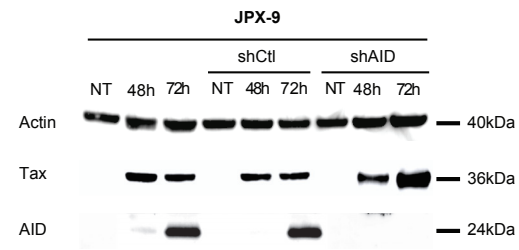


Figure S6

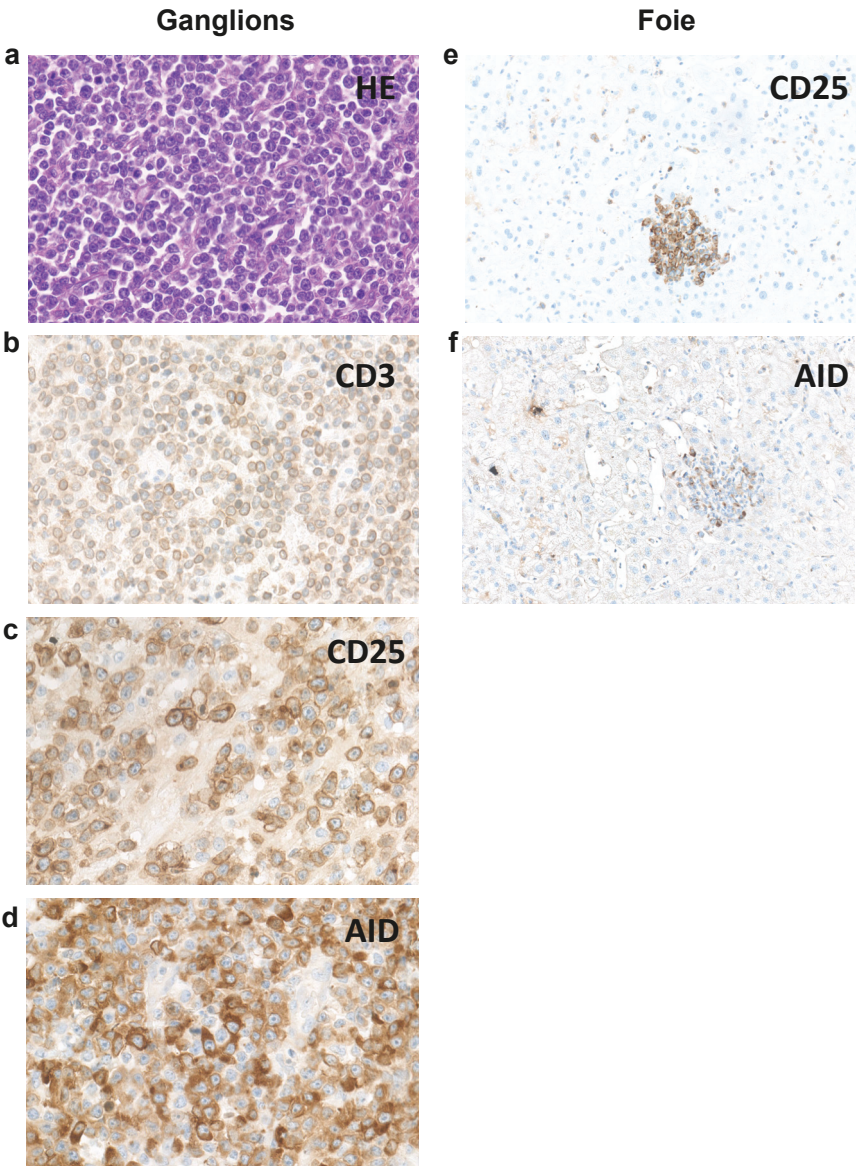
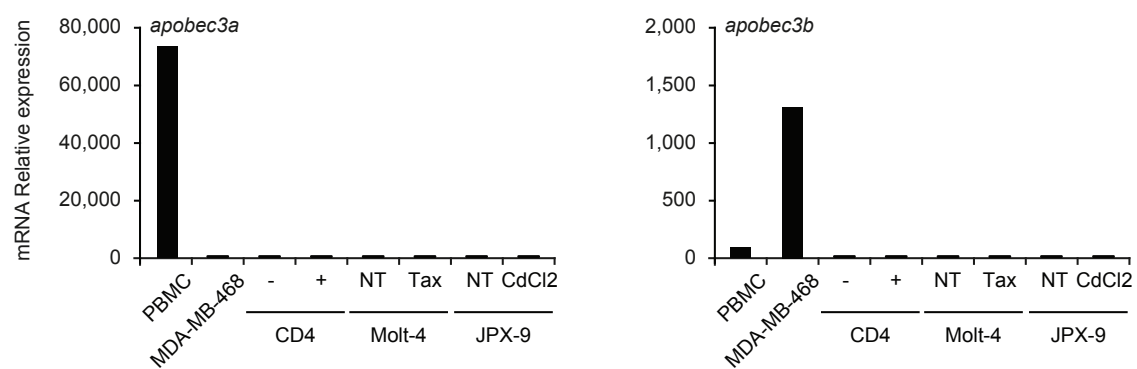


Figure S7



4.1.4. Résultats complémentaires

4.1.4.1. AID induit l'expression des ligands de NKG2D dans les LT CD4⁺ infectés.

L'implication de AID dans l'up-régulation des ligands de NKG2D lors d'infections virales a été démontré dans deux études publiées en 2006 et 2013 (Bekerman et al., 2013; Gourzi et al., 2006). Ils ont démontré que l'induction de l'expression de AID suite à l'infection par A-MuLV et KSHV induit l'expression des ligands de NKG2D et permet ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK. Afin de tester le rôle de AID dans l'up-régulation des ligands de NKG2D des cellules infectées par HTLV-1, des LT CD4⁺ primaires ont été ou non transduits avec un vecteur lentiviral permettant l'expression d'un shRNA spécifique de AID. Ces cellules ont ensuite été infectées par co-culture avec des MT-2 productrices de virion HTLV-1. Nous avons ensuite analysé par cytométrie en flux l'expression de ULBP1, 2, 3 et MICA/B dans les cellules infectées par HTLV-1 exprimant ou non AID. Nos résultats montrent que l'expression des ligands de NKG2D semble restreinte aux cellules exprimant AID. En effet la down-régulation de l'expression de AID par shRNA diminue de manière significative l'expression des ligands de NKG2D. Ces résultats suggèrent que l'expression de AID dans les cellules infectées pourrait participer à l'élimination des cellules infectées par les cellules du système immunitaire.

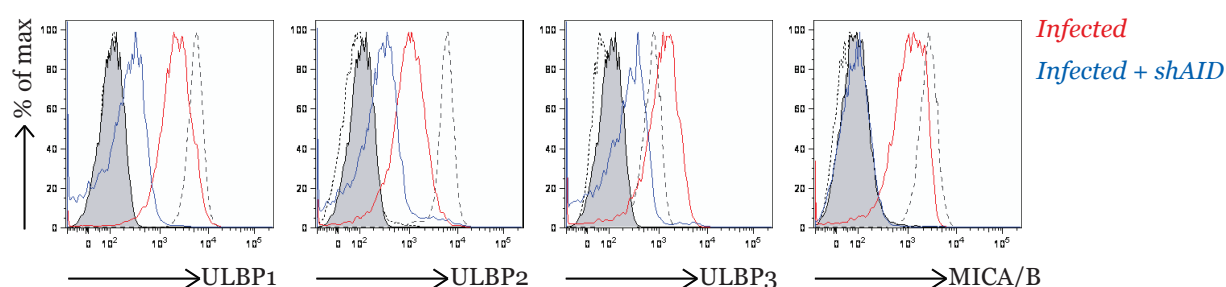


Figure 21 : Expression des ligands de NKG2D dans les LT CD4⁺ infectés par HTLV-1. Analyse en cytométrie de flux des ligands de NKG2D, ULBP1, 2 et 3 et MICA/B par les LT CD4⁺ infectés par HTLV-1 exprimant (rouge) ou non (bleu) AID, les LT CD4⁺ non-infectés (pointillés), les LT CD4⁺ traités à l'étoposide (pointillés longs). L'isotype contrôle est marqué par la courbe grise pleine.

4.1.4.2. Twist-1 est exprimé dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.

Une étude publiée dans Blood en 2010 puis rétractée avait démontré une expression du facteur de transcription Twist-1 dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 ainsi que dans quelques échantillons de cellules ATL. La protéine Twist-1 est depuis quelques années considérée comme un oncogène puissant impliqué notamment dans la prolifération, l'apoptose, la chimiorésistance. (Vernon et al., 2004 ; Cheng et al., 2008). Twist-1 est notamment capable d'activer la voie NF- κ B et pourrait donc participer au maintien de l'expression de AID en absence de Tax. Il est également bien connu que la capacité de Twist-1 à inhiber l'apoptose réside dans son pouvoir de bloquer la voie p53 (Maestro et al., 1999). Twist-1 pourrait ainsi participer à la survie cellulaire et à l'accumulation de lésions génomiques en bloquant la voie p53.

Dans un premier temps nous avons voulu confirmer les résultats de Tanji *et al.* nous avons analysé par RT-qPCR et western blotting les transcrits et protéine de Twist-1 dans nos lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 ainsi que dans des lignées cellulaires T non-infectées.

Nos résultats démontrent que l'expression de Twist-1 est restreinte aux lignées cellulaires infectées par HTLV-1 (Figure 22) confirmant les résultats obtenus par Tanji. Parmi les lignées cellulaires non-infectées il faut noter que la lignée HUT-78 exprime les transcrits de Twist-1. Ces résultats sont cohérents avec la littérature car la lignée HUT-78 est dérivée d'un syndrome de Sézary dont les cellules sont connues pour exprimer Twist-1.

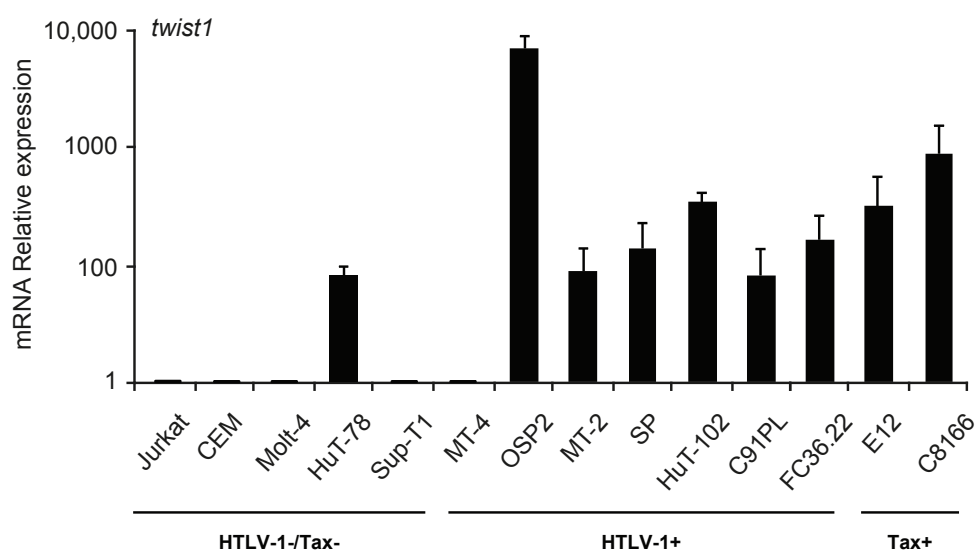


Figure 22 : Expression des transcrits de Twist-1 dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1.

4.1.4.3. Twist-1 est exprimé dans LT CD4⁺ infectés par HTLV-1

Après avoir confirmé l'expression de Twist-1 dans les lignées cellulaires infectées par HTLV-1 nous avons testé l'expression de Twist-1 dans nos modèles de LT CD4⁺ primaires infectés par HTLV-1 ainsi que dans les LT CD4⁺ issus de rate de souris BRG et NSG infectés. L'analyse en RT-qPCR des transcrits de Twist-1 a révélé une expression de Twist-1 dans les LT CD4⁺ primaires infectés mais pas dans les LT CD4⁺ non-infectés (Figure 23). De même nous avons retrouvé l'expression des transcrits de Twist-1 dans les splénocytes de souris HLS-BRG infectées (n=3) mais pas dans les non-infectés (n=3) ainsi que dans les LT CD4⁺ issus de rate de souris HLS-NSG infectées (n=5) alors que les LT CD4⁺ issus de souris non-infectées n'expriment pas Twist-1 (Figure 23). Ces résultats ont également été confirmés dans les cellules jPX-9 et dans les Molt4 transduites ou non avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax.

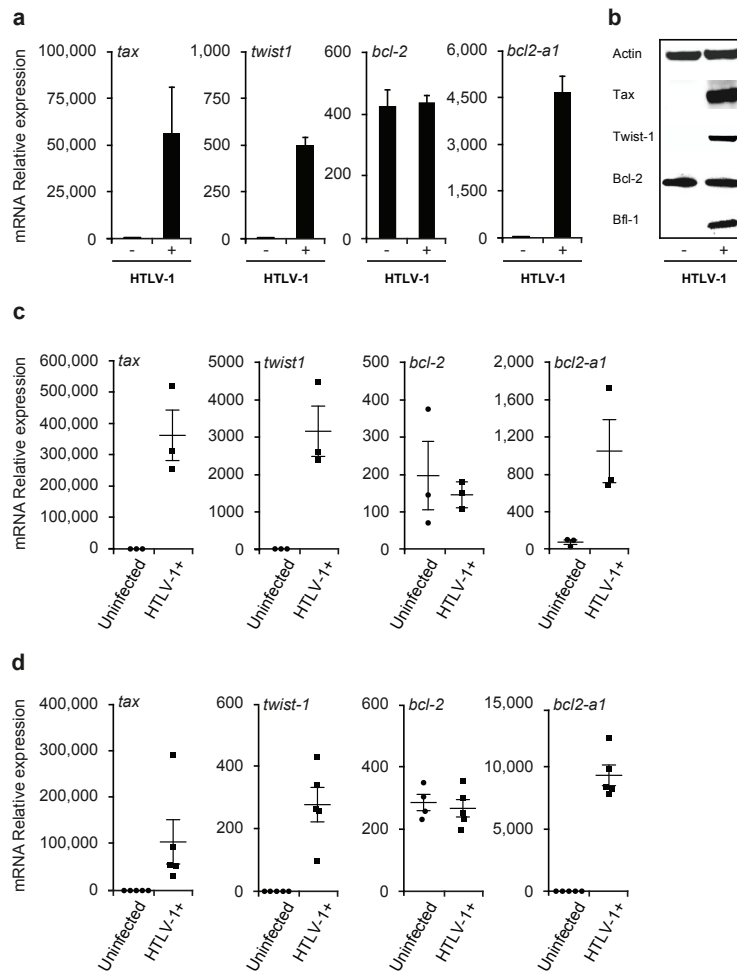


Figure 23 : Twist-1 est exprimé dans les LT CD4+ primaires infectés par HTLV-1. Expression des transcrits de Twist-1 dans les a) LT CD4+ infectés par HTLV-1, c) les splénocytes de souris HIS-BRG infectés, d) les LT CD4+ issus de rate de souris HIS-NSG infectées.

4.1.4.4. L'inhibition de l'expression de Twist-1 dans LT CD4+ infectés par HTLV-1 n'affecte pas l'expression de AID

Twist-1 étant capable d'activer les facteurs NF-kB nous avons spéculé qu'il pourrait induire l'expression de AID en absence de Tax. Nous avons transduit les Molt4 avec un shRNA anti-Twist-1 puis avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax afin de tester si l'inhibition de l'expression de Twist-1 pouvait impacter l'induction de l'expression de AID par Tax. Nos résultats obtenus par RT-qPCR ne montrent aucun effet de l'inhibition de l'expression de Twist-1 sur l'expression de AID (Figure 24). Twist-1 ne semble donc pas jouer de rôle dans l'expression de AID. Cependant l'influence de Tax sur l'expression de AID est peut être suffisante pour s'affranchir de toute autre effet de facteurs de transcription tel que Twist-1. Il serait donc intéressant de voir si l'expression de Twist-1 en transduisant un vecteur d'expression de Twist-1 induit l'expression de AID.

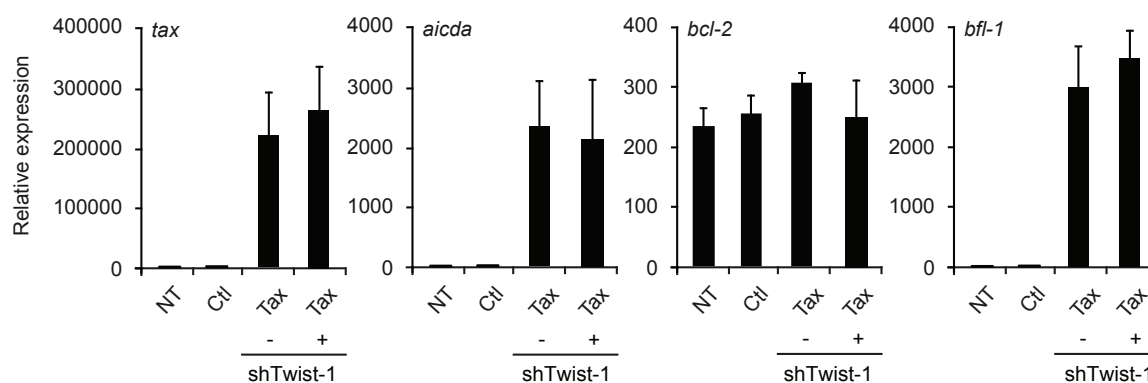


Figure 24 : Twist-1 ne module pas l'expression de AID dans les Molt4-Tax. Analyse des transcrits de AID dans les Molt4-Tax exprimant ou non Twist-1.

4.2. Article 2 : Tax-induced expression of the anti-apoptotic bfl-1 protein contributes to survival of HTLV-1-infected t-cells

4.2.1. Principaux résultats

Le deuxième axe de cette thèse était d'étudier les mécanismes de survie permettant la persistance et l'accumulation des endommagements à l'ADN générés par AID. Dans une cellule saine, les dommages à l'ADN sont repérés puis réparés par la voie de réparations de l'ADN tel que la voie ATM-p53. Les cellules ayant accumulé trop de lésions de l'ADN sont éliminées soit par le système immunitaire soit par apoptose. Une survie aberrante des cellules est impliquée i) dans l'échappement à la surveillance du système immunitaire permettant l'accumulation de lésions de l'ADN et la progression tumorale, ii) dans la chimiorésistance. Le fait que l'ATL se développe après une longue période asymptomatique d'environ 30-50 ans après la primo infection par HTLV-1, que les cellules ATL sont chimiorésistantes à la plupart des drogues conventionnelles et qu'un clone d'ATL peut persister jusqu'à 7 ans chez un patient (Etoh et al., 1997) indique une forte résistance à l'apoptose des cellules infectées par HTLV-1. Des études ont d'ailleurs démontré que Tax induisait l'activation des voies NF- κ B et AP-1 (c-Jun, JunD et c-Fos) qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, sont des facteurs majeurs de la survie cellulaire (Suzuki et al., 1994 ; Iwai et al., 2001 ; Hall et Fujii, 2005 ; Sun et Yamaoka, 2005). L'activation de ces voies conduit à l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que la survivin, c-Flip ou encore certaines protéines de la famille Bcl-2 (Mori et al., 2001 ; Grassmann et al., 2005 ; Haal et Fujii, 2005 ; Silbermann et Grassmann, 2007). En effet, au début des années 2000 plusieurs études ont révélées que Tax induisait l'expression de deux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les protéines Bcl-x_L et Bfl-1 (Nicot et al., 2001 ; Mori et al., 2001 ; de la Fuente et al., 2003). Des travaux précédents de l'équipe, avaient démontré que la surexpression de Bfl-1 dans des cellules B malignes était associée à une meilleure survie des cellules tumorales et en particulier lors d'un traitement par des agents chimiothérapeutiques. Sur la base de ces travaux et de ceux de de la Fuente () démontrant l'induction de l'expression de Bfl-1 par la protéine virale Tax, j'ai en collaboration avec Héloïse Macaire étudiante en thèse au laboratoire, disséqué les mécanismes de régulation de

Bfl-1 par les protéines virales Tax et HBZ et étudié le rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules HTLV-1+.

Dans un premier temps nous avons étudié les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 par Tax. Nous avons tout d'abord confirmé l'expression de Bfl-1 dans les cellules infectées par HTLV-1. L'analyse transcriptomique et protéomique de Bfl-1 a montré que toutes les lignées cellulaires T infectées expriment Bfl-1 alors que les lignées non-infectées non. De plus nous avons examiné l'expression de la protéine Bfl-1 dans des PBMC de donneurs sains et dans des échantillons d'ATL. La protéine de Bfl-1 a été observée dans 2 des 4 échantillons d'ATL. Ces analyses confirment l'expression de Bfl-1 dans les cellules infectées par HTLV-1 et montrent pour la première fois la présence de la protéine de Bfl-1 dans des cellules ATL. Ces résultats ont été validés *in vivo* dans les thymocytes de souris BRG infectées par HTLV-1 par l'équipe de Madeleine Duc-Dodon (Villaudy et al., 2011 ; Riquet al., Figure 1c Article 1) ainsi que dans les LT CD4+ de rate de souris NSG infectées par HTLV-1 (Riquet al., Figure 1d Article 1).

Le fait que l'expression de bfl-1 soit activée par les voies NF- κ B et AP-1 et que Tax soit capable d'induire et d'activer ces mêmes voies nous a conduit à spéculer que Tax induit l'expression de Bfl-1 via la voie NF- κ B et/ou AP-1. Avant d'analyser l'implication de ces deux voies dans la régulation de l'expression de Bfl-1 nous avons tout d'abord validé que l'expression de Bfl-1 était dépendante de Tax. Pour ce faire nous avons utilisé des cellules JPX-9 dans lesquelles l'induction de l'expression de Tax est associée à l'expression de Bfl-1. Nous avons également utilisé un shRNA anti-Tax dans les cellules T E12, qui expriment Tax. L'utilisation de ces shRNA conduit à une inhibition de l'expression des ARNm de Tax et Bfl-1 d'environ 80% et 60% respectivement.

Afin d'élucider les mécanismes de régulation de l'expression de Bfl-1 par Tax nous avons transfecté des cellules HeLa et des Jurkat avec des plasmides permettant l'expression de formes mutées de Tax : TaxM22 (Δ NF- κ B) et Tax M47 (Δ CREB/ATF). Le mutant M47 active efficacement la transcription de Bfl-1 alors que le mutant M22 en est incapable. Ces données suggèrent donc que la voie classique de NF- κ B est impliquée dans l'activation du promoteur de Bfl-1. La confirmation de l'implication de la voie NF- κ B est venue de l'utilisation dans les HeLa d'un mutant de I κ B α insensible à la dégradation permettant ainsi une inhibition efficace de NF- κ B.

les essais luciférase réalisés dans ces cellules ont confirmé que Tax *trans*-active le promoteur de *bfl-1* par la voie classique de NF- κ B.

Le promoteur de *bfl-1* contenant des sites de fixation pour les facteurs de la famille AP-1 (c-Jun, JunD et JunB) et le mutant Tax M22 étant en réalité également incapable d'activer les voies AP-1, nous nous sommes demandé si Tax était capable de *trans*-activer le promoteur de *bfl-1* par les voies AP-1. Des essais luciférase menés sur ce promoteur ont démontré que les facteurs c-Jun et JunD était capable d'activer le promoteur de *bfl-1* mais pas JunB. Nous avons ensuite analysé la coopération de Tax et C-Jun ou JunD sur l'activation du promoteur de *bfl-1* ainsi que sur l'expression endogène de Bfl-1. Les résultats démontrent pour la première fois que Tax synergise avec C-Jun et JunD pour *trans*-activer le promoteur de *bfl-1*.

Comme nous avons retrouvé une expression de Bfl-1 dans des certaines cellules ATL alors que Tax n'est plus exprimé dans environ 60% des cas d'ATL nous avons voulu savoir si d'autres protéines virales pouvaient également induire l'expression de Bfl-1. La protéine HBZ est exprimée de manière constante et constitutive dans les cellules infectées par HTLV-1 ainsi que dans les ATL (Satou et al., 2006). De plus HBZ est capable de moduler l'expression de certains gènes cellulaires via les facteurs c-Jun et JunD. Nous avons donc comme pour Tax étudié la coopération de HBZ, c-Jun et JunD vis-à-vis de l'activation du promoteur de *bfl-1*. Nos résultats mettent en avant que l'expression de HBZ seule n'induit pas l'activation de *bfl-1*. De manière intéressante HBZ réprime l'activation du promoteur de *bfl-1* par c-Jun mais coopère avec JunD pour *trans*-activer *bfl-1*. De la même manière HBZ réprime la coopération Tax/c-Jun sur l'activation de *bfl-1* mais va amplifier la *trans*-activation de *bfl-1* induite par Tax/JunD.

Nos résultats indiquent donc que l'activation du promoteur de *bfl-1* dans les cellules infectées par HTLV-1 est régulée par les protéines virale Tax et HBZ via les voies NF- κ B et AP-1.

La deuxième partie de cette étude a consisté à étudier le rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules T infectées par HTLV-1. L'utilisation de shRNA anti-Tax ou anti-Bfl-1 compromet sensiblement la survie des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. En revanche l'extinction de l'expression de Bcl-x_L ou de Bcl-2 n'a pas ou peu d'effet sur la survie cellulaire. Ces données indiquent pour la première fois un rôle majeur de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées par HTLV-1. Il est à noter que l'extinction de

bfl-1 seul n'induit pas la mort cellulaire dans 100% des cas. En revanche une double extinction de Bfl-1 et de Bcl-xL induit la mort de la quasi totalité des cellules, suggérant que Bcl-xL pourrait coopérer avec Bfl-1 dans la résistance à l'apoptose des lignées cellulaires infectées par HTLV-1. Nous avons également observé que l'extinction de l'expression de Bfl-1 par shRNA sensibilise les lignées cellulaires T HTLV-1+ à l'étoposide ou encore l'ABT-737, une molécule ciblant principalement Bcl-2. De plus nous avons mis en évidence que l'extinction de Bfl-1 restaure la sensibilité des cellules à la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de nombreux lymphomes. Ces résultats suggèrent pour la première fois un rôle potentiel de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées ainsi que dans la chimiorésistance des cellules ATL.

En conclusion il semble évident que Tax est l'inducteur majeur de l'expression de Bfl-1 dans les cellules infectées par HTLV-1. Cette *trans*-activation du promoteur de *bfl-1* se fait par le biais des voies classiques de NF- κ B et AP-1 (c-Jun et JunD). L'effet mitigé de HBZ sur l'expression de Bfl-1 suggère que Bfl-1 est indispensable dans les phases précoces du développement de l'ATL, lorsque Tax est fortement exprimé. L'expression résiduelle de Bfl-1 dans les ATL semblerait plus due à l'expression constitutive de NF- κ B dans ces cellules. La grande avancée de travail est la preuve de l'implication de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées par HTLV-1. Bfl-1 apparaît comme un candidat responsable de la chimiorésistance des cellules ATL et représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des formes agressives d'ATL.

Ces travaux ont d'ailleurs donné lieu à des études sur le développement de petites molécules ciblant spécifiquement Bfl-1, menées par Héloïse Macaire.

4.3. Article 2 : Tax protein-induced expression of antiapoptotic Bfl-1 protein contributes to survival of HTLV-1-infected T-cells

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 25, PP. 21357–21370, JUNE 15, 2012
© 2012 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PUBLISHED IN THE U.S.A.

Tax Protein-induced Expression of Antiapoptotic Bfl-1 Protein Contributes to Survival of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)-infected T-cells^{*[S]♦}

Received for publication, January 13, 2012, and in revised form, April 23, 2012. Published, JBC Papers in Press, May 2, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.340992

Héloïse Macaire^{‡§1,2}, Aurélien Riquet^{‡§¶1,3}, Vincent Moncollin^{¶||}, Marie-Claude Biémont-Trescol^{‡§¶}, Madeleine Duc Dodon^{‡¶||}, Olivier Hermine^{**,¶}, Anne-Laure Debaud^{‡§¶}, Renaud Mahieux^{‡¶¶4}, Jean-Michel Mesnard^{§§}, Marlène Pierre^{‡§¶}, Louis Gazzolo^{‡¶||}, Nathalie Bonnefoy^{‡§¶¶}, and Hélène Valentin^{‡§¶5}

From the [‡]Université de Lyon, Lyon, [§]INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon F-69007, the [¶]Université de Lyon 1, UMS3444/US8, Lyon, the ^{||}Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR5239 CNRS/Ecole Normale Supérieure, 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69007, ^{**}CNRS, UMR8603, Hôpital Necker, 149–161 Rue de Sévres, Paris, F-75015, ^{¶¶}INSERM, U758, Ecole Normale Supérieure-Lyon, 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69007, ^{§§}Centre d'Études d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé/CNRS/UMR5236, 1919 Route de Mende, Montpellier, F-34060, and the ^{¶¶}Hospices Civils de Lyon, Lyon, F-69229 Cedex 02, France

Background: Antiapoptotic Bcl-2 proteins are up-regulated in HTLV-1-infected T-cells.

Results: Antiapoptotic Bfl-1 protein is regulated by viral Tax and HBZ proteins and is involved in survival of HTLV-1-transformed T-cells.

Conclusion: Bfl-1, as well as Bcl-x_L, induces resistance to apoptosis in HTLV-1-transformed T-cells.

Significance: We provide evidence for Bfl-1 and Bcl-x_L as potential therapeutic targets in the treatment of leukemia/lymphoma associated with HTLV-1.

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). ATLL is a severe malignancy with no effective treatment. HTLV-1 regulatory proteins Tax and HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) play a major role in ATLL development, by interfering with cellular functions such as CD4⁺ T-cell survival. In this study, we observed that the expression of Bfl-1, an antiapoptotic protein of the Bcl-2 family, is restricted to HTLV-1-infected T-cell lines and to T-cells expressing both Tax and HBZ proteins. We showed that Tax-induced *bfl-1* transcription through the canonical NF- κ B pathway. Moreover, we demonstrated that Tax cooperated with c-Jun or JunD, but not JunB, transcription factors of the AP-1 family to stimulate *bfl-1* gene activation. By contrast, HBZ inhibited c-Jun-induced *bfl-1* gene activation, whereas it increased JunD-induced *bfl-1* gene activation. We identified one NF- κ B, targeted by RelA, c-Rel, RelB, p105/p50, and p100/p52, and two AP-1, targeted by both c-Jun and JunD, binding sites in the *bfl-1* promoter of T-cells expressing both Tax and HBZ. Analyzing the potential role of antiapoptotic Bcl-2 proteins in HTLV-1-infected T-cell survival, we demonstrated that these cells are differentially sensitive to silencing of Bfl-1, Bcl-x_L, and Bcl-2. Indeed, both Bfl-1 and Bcl-x_L knock-

downs decreased the survival of HTLV-1-infected T-cell lines, although no cell death was observed after Bcl-2 knockdown. Furthermore, we demonstrated that Bfl-1 knockdown sensitizes HTLV-1-infected T-cells to ABT-737 or etoposide treatment. Our results directly implicate Bfl-1 and Bcl-x_L in HTLV-1-infected T-cell survival and suggest that both Bfl-1 and Bcl-x_L represent potential therapeutic targets for ATLL treatment.

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL)⁶ is associated with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection. It is an aggressive malignancy of mature activated CD4⁺ T-cells and in rare cases of CD4⁺CD8⁺ or CD8⁺ T-cells. Among the 10–20 million people infected with HTLV-1 worldwide, 2–10% will develop an ATLL after a long period of clinical latency. ATLL is characterized by the persistence and clonal expansion of CD4⁺-infected T-cells (1, 2), but the molecular mechanisms of ATLL development are complex and remain incompletely understood. Some of these mechanisms are related to the expression of the regulatory viral Tax protein and of the HTLV-1 basic leucine zipper (bZIP) factor (HBZ) (3). The oncoprotein Tax is highly expressed in early stages of ATLL development, although its expression decreases to become almost undetectable in most ATLL cells (4–6). Strong evidence indicates that Tax plays a central role in T-cell transformation both

^{*} This work was supported in part by institutional grants from INSERM and UCBL and from Région Rhône-Alpes Cluster 10, Cent pour Sang la Vie, Fondation de France, and the Ar'mony.

[♦] This article was selected as a Paper of the week.

^[S] This article contains supplemental Figs. S1–S3 and Tables S1–S5.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by a fellowship from Convention for Industrial Research Training (Imaxio Biotech).

³ Supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

⁴ Supported by a grant from National Cancer Institute (InCa).

⁵ Permanent CNRS researcher. To whom correspondence should be addressed: UMR5239 Faculté de Médecine Lyon-Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet, BP12, 69921 Oullins Cedex, France. Tel.: 33-4-26-23-59-81; Fax: 33-4-26-23-59-00; E-mail: valentin@ens-lyon.fr.

⁶ The abbreviations used are: ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; HTLV-1, human T-cell leukemia virus type 1; NF- κ B, nuclear factor- κ B; AP-1, activator protein-1; HBZ, HTLV-1 basic leucine zipper factor; Bcl-2, B-cell lymphoma gene-2; Bfl-1, Bcl-2 fetal liver; Bcl-x_L, Bcl-2 like long; LMP-1, latent membrane protein 1; EBNA2, EBV nuclear antigen 2; I κ B α DN, dominant-negative I κ B α ; Δ AD, deleted activation domain; Δ bZIP, deleted basic leucine zipper; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; PI, propidium iodide; Ctl, control; Luc/Ruc, Firefly luciferase/Renilla luciferase.

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

in vitro in human cells and *in vivo* in transgenic animal models. However, Tax-induced immortalization of human primary T-cells is a very rare event (7–13). Tax modulates cellular gene expression and interferes with the control of cell survival, proliferation, and genetic stability of infected cells (14–16). Tax does not directly bind to DNA, but it promotes the recruitment of transcription factors on targeted cellular genes. In particular, Tax activates survival transcription factors, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) members, which in turn increase the expression of antiapoptotic proteins (16–21). As a consequence, both HTLV-1- and Tax-transformed T-cells show higher resistance to apoptosis than untransformed control cells (18, 22).

Although Tax is not detectable in 60% of ATLL cases, HBZ remains expressed through all stages of the ATLL process (14, 15, 23–27). HBZ controls gene transcription by interacting with Jun members of the AP-1 family through their bZIP domain (28). An increasing number of studies report that HBZ promotes T-cell proliferation and inflammation and suggest that HBZ participates in the maintenance of tumoral phenotype (23, 28–32).

Many viruses responsible for the development of leukemia/lymphoma have evolved to escape immune surveillance. Some of them inhibit apoptosis by encoding viral Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) analogs, which mimic their cellular antiapoptotic function. Others up-regulate the expression of cellular antiapoptotic Bcl-2 proteins (33–35). Impaired apoptosis associated with an imbalance of the expression of Bcl-2 members in favor of antiapoptotic proteins is a hallmark of human hematopoietic malignancies and is frequently associated with resistance to therapy (36, 37). The NF- κ B transcription factors have been shown to directly up-regulate both *bfl-1* (Bcl-2 fetal liver) and *bcl-x_L* (Bcl-2-like long) gene expression, and overexpression of both proteins has been associated with increased resistance of tumor cells to apoptotic stimuli or to chemotherapeutic drugs (38–47). Interestingly, several data point out a potential role for NF- κ B-mediated *bfl-1* and *bcl-x_L* overexpression, by viral proteins, in both B- and T-lymphoma/leukemia. Indeed, the *bfl-1* promoter is activated by EBV latent membrane protein 1 (LMP1), as well as by EBV nuclear antigen 2 (EBNA2) and HTLV-1 Tax proteins (48–50). Similarly, *bcl-x_L* gene is activated by EBV LMP2A and HTLV-1 Tax proteins in B- and T-cells, respectively (51–53). Although the regulation of *bcl-x_L* by Tax protein has already been documented, the mechanism underlying the regulation of *bfl-1* expression by viral Tax and HBZ proteins and the involvement of Bfl-1 in HTLV-1-infected T-cell survival remain unknown.

Here, we report that Bfl-1 is expressed in HTLV-1-infected T-cell lines but not in uninfected T-cells. We demonstrated that Tax induces Bfl-1 expression through the canonical NF- κ B pathway but also synergizes with JunD or c-Jun of the AP-1 family to activate *bfl-1* transcription. By contrast, HBZ modulates Jun-mediated *bfl-1* gene activation. Moreover, both NF- κ B and AP-1 bind to different sites of the *bfl-1* promoter in a T-cell line stably expressing *tax*, *hbz*, and *bfl-1* transcripts. Finally, we showed that knockdown of Bfl-1 or Bcl-x_L, but not Bcl-2, decreases HTLV-1-infected T-cell survival and that targeting both Bfl-1 and Bcl-x_L restored full cell death. Altogether,

our data strongly suggest that Bfl-1 and Bcl-x_L represent potential therapeutic targets for ATLL treatment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Plasmids—The monoclonal antibodies (mAbs) used were either mouse anti-Bcl-x_L (2H12) (Pharmin-gen), anti-Bcl-2 (124, Dako SA), anti-Mcl-1 (SC-12756, Tebu-bio), anti-c-Jun (OP55, Merck), anti-FLAG (F3165, Sigma), anti-c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, sc-40), or anti- β -actin (Sigma). We also used rabbit polyclonal antibodies anti-actin (Sigma), anti-GST-Bfl-1 (kindly provided by J. Borst, The Netherlands Cancer Institute), anti-I κ B α (44D4, Cell Signaling), and allophycocyanin-conjugated anti-active caspase-3 (Pharmin-gen). The mouse mAb anti-Tax hybridoma (168A51-42) was a kind gift of AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, National Institutes of Health). Secondary reagents used were ECL anti-rabbit IgG horseradish peroxidase from donkey and anti-mouse IgG horseradish peroxidase from sheep (GE Healthcare).

Plasmids used were as follows: empty-pSG5M, pSG5M-Tax-WT, pSG5M-Tax-M22, and pSG5M-Tax-M47 (54, 55); empty-pJFE and pJFE-Tax-WT (kindly provided by F. Bex, Belgium (56)); empty-pcDNA3, pcDNA-JunB, pcDNA-c-Jun, and pCMV-JunD-FLAG (57, 58); $-1374/+81$ -*bfl-1* promoter-driven luciferase gene (Bfl-1-Luc, kindly provided by D. Walls, Dublin, Ireland (50)); pRL-TK-*Renilla* luciferase (pRL-TK-Ruc, Promega); pCMV4-HA-I κ B α S32A/S36A (59), and NF- κ B and 5'LTR-HTLV-1-driven luciferase gene (NF- κ B-Luc and LTR-HTLV-1-Luc (60)). pcDNA-HBZ-Myc encoding sHBZ and the mutated sHBZ forms deleted for activation (HBZ Δ AD) and for bZIP (HBZ Δ bZIP) domains were described previously (57, 61).

Cells—HeLa cell line was grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% endotoxin-free FCS (Lonza), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, and 40 μ g/ml gentamicin (Invitrogen). The HTLV-1-infected MT-2, MT-4, C8166-45, SP, and FC36.22 T-cell lines were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. The HTLV-1-infected T-cell lines C91PL and HuT-102 were provided by E. Wattel (Lyon, France) and R. Mahieux, respectively. Uninfected human leukemia Jurkat (Clone E6–1), Sup-T1, Molt-4 (Clone 8) and CEM, and lymphoma HuT-78 T-cell lines, which served as negative controls, were obtained from AIDS Research and Reference Reagent Program. JPX-9 cells are derivatives of Jurkat, which have a stably integrated *tax* gene under the control of a metallothionein promoter and are kindly provided by M. Nakamura (Tohoku University, Japan (62)). To induce Tax expression, JPX-9 cells were cultured in the presence of 20 μ M CdCl₂. Stably Tax/HBZ-expressing Jurkat (E12 clone) T-cells were obtained as reported previously (63). The T-cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented as for DMEM medium. FC36.22 and SP cells were cultured in the presence of 4% of homemade IL-2.

We used frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lyon, France) and ATLL patients (Prof. O. Hermine, H. Necker, Paris, France). The clinical status of the ATLL patients at the time of sample collection is summarized in supplemental Table S1. Fresh human PBMC were stimulated with mAbs anti-CD3/

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

CD28 (Dynabeads Human T-cell activator, Invitrogen) 48 h prior to transduction. Then the Tax-expressing T-cells were obtained by transduction of stimulated PBMC with a lentivirus vector encoding a HTLV-1 Tax-enhanced YFP fusion, as described previously (64). The obtained CD4⁺ Tax-T-cells were grown in complete RPMI medium supplemented with 1% (v/v) Eagle's minimum essential medium nonessential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, and 200 units/ml human IL-2 (PeproTech). Untransduced T-cells from blood were sorted by FACS according to CD4 and CD8 expression using FACSVantage SE option Diva (BD Biosciences). Purity was over 90%.

RNA Extraction and Real Time RT-PCR— $0.5\text{--}2 \times 10^6$ T-cells were lysed using TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNAs were obtained as described previously (65). $0.1\text{--}0.5 \times 10^6$ transfected HeLa cells were lysed according to the manufacturer's specifications (SV total RNA isolation kit, Promega). The real time RT-PCR was performed with FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science) on a StepOne Plus machine (Applied Biosystems) using 4 μ M of each primer (supplemental Table S2). cDNA levels were normalized using the housekeeping *HPRT* and *GusB* genes. Each sample was run in triplicate, and the data were analyzed as described previously (65).

Immunoblotting Analysis— $2\text{--}5 \times 10^6$ cells were lysed in 50 μ l of Nonidet P-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, and 1% Nonidet P-40) supplemented with protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). Cytoplasmic protein extracts (70–100 μ g) were separated on a NuPAGE 4–12% BisTris gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen). Protein expression was analyzed by immunoblotting using specific Abs. Protein-Ab complexes were visualized by chemiluminescence (Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus; PerkinElmer Life Sciences).

Transduction Assays—RNA interference sequences are summarized in supplemental Table S3. Corresponding oligonucleotides were cloned into the lentiviral vector pLL3.7 co-expressing GFP as described previously (47). 3×10^5 cells were cultured in a 6-well plate for 24 h. The cells were then transduced with lentiviral vector expressing specific shRNA at 16 multiplicities of infection in the presence of Polybrene (Sigma), as performed previously (47). Cells were collected at days 5–7 to evaluate efficiency of transduction (GFP⁺) by flow cytometry, mRNA, or protein extinction and mortality by flow cytometry after staining with 0.5 μ g/ml propidium iodide (PI⁺).

Transfections and Luciferase Assays— 2.5×10^5 or 1.25×10^5 HeLa cells were plated on 6- or 24-well plates overnight, respectively. Then, cells were transiently transfected with 3 μ g/6-well or 1 μ g/24-well plasmids using JetPEI according to the manufacturer's protocol (Ozyme). 48 h post-transfection, cells were collected for RNA and protein extractions or for luciferase assays. To compare the amounts of expressing vectors between experiments performed in 6 and 24 wells, amounts are presented in the figures as nanograms or micrograms of interest plasmid/ μ g of total transfected vectors. Luciferase activities were determined in triplicate using a luciferase assay kit system (Dual-Glo[®], Promega) and a luminometer (Infinite M200, Tecan) according to the manufacturer's specifications. Lucifer-

ase activity was calculated using the ratio Luc/Ruc. Normalized luminescence values are presented as relative fold *trans*-activation by comparison with the basal *bfl-1* luciferase activity obtained using empty vector, which was arbitrarily set up to one.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) and Supershift—For the preparation of nuclear extracts, 10^7 cells were washed with PBS, and the volume of the pellet was determined. Cells were resuspended in a 4-pellet volume of cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 5 mM DTT) with protease inhibitors (Sigma). After 15 min on ice, cells were lysed by homogenization in a loose-pestle Dounce, and the mixture was centrifuged at $5,000 \times g$ at 4 °C for 10 min in an Eppendorf microcentrifuge. The pellet was resuspended in 4 pellet volumes of nuclear lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8), 20% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT) with protease inhibitors and incubated on ice for 15 min. The mixture was then homogenized in a tight pestle Dounce and centrifuged $10,000 \times g$ at 4 °C for 10 min. The resulting supernatant was used as the nuclear extracts in EMSA.

DNA-protein complexes were formed by a 45-min incubation of the extracts with DNA fragments at 25 °C in a 20- μ l final volume reaction (20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40) and with 0.5–1 μ g of poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (Sigma). Reactions were then complemented with 1 μ l of glycerol and loaded either on a 20 $\times$ 20-cm nondenaturing 4.5% polyacrylamide gel (TBE 1 $\times$, acrylamide/bisacrylamide 60:1 ratio) in the case of [γ -³²P]ATP-labeled DNA or a 10 $\times$ 10-cm 1% agarose gel in the case of unlabeled DNA. Acrylamide gels were dried, and autoradiographed and agarose gels were "stained" by ethidium bromide. Double-stranded synthetic oligonucleotides corresponding to binding sites from the proximal part of the *bfl-1* promoter were labeled with [γ -³²P]ATP (PerkinElmer Life Sciences) by using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and then purified on a ProbeQuant G-50 Micro-column (GE Healthcare) and used as probes. The sequences of the oligonucleotides used were as follows: κ B52-F, 5'-GCAAACAGAAATTCCTCCAGCCTC-3' (NF- κ B site); AP-104-F, 5'-TTTCATACATGACATGAAACACAGCCT-3' (AP-1 site); and AP74-F, 5'-CGCACGAAAGTGACTAGGAGGAA-3' (AP-1 site).

To identify transcription factors in the DNA-protein complexes shown in EMSA, we used antibodies specific for c-Jun (sc-74543X, Santa Cruz Biotechnology) and JunD (sc-74X, Santa Cruz Biotechnology) and for various NF- κ B pathways, including p105/p50 (Ab7971, Abcam), p100/p52 (ab7972, Abcam), p65/RelA (CS-204359, Millipore), RelB (sc-28689X, Santa Cruz Biotechnology), and c-Rel (sc-71X, Santa Cruz Biotechnology). These antibodies were incubated with the nuclear extracts from E12 T-cell clone for 15 min at 25 °C before incubation with the DNA fragments to elicit a supershift of DNA-protein complexes. The supershift was detected on agarose gels.

Cell Death Assay—T-cell lines (4×10^5 /ml) were cultured in the absence or presence of various concentrations of DMSO, ABT-737 (Euromedex, Selleck Chem) (66) or etoposide (Sigma). 48 h after treatment, mortality was determined by flow cytometry after staining with PI or with allophycocyanin-con-

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

jugated rabbit anti-active caspase-3 antibody after fixation and permeabilization using the BD Cytotfix/Cytoperm™ kit.

Statistical Analysis—Statistical analysis of the differences between the groups was performed using *t* test with *p* < 0.05 considered statistically significant.

RESULTS

Antiapoptotic Bfl-1 Protein Is Overexpressed in HTLV-1-infected T-cells—De la Fuente *et al.* (48) reported an activation of the *bfl-1* promoter in a Tax-transfected T-cell line. To gain a more precise view of the expression of Bfl-1 in the context of HTLV-1 infection, we analyzed mRNA and protein expression of Bfl-1 in HTLV-1-infected and -uninfected T-cells harboring different phenotypes. HTLV-1-transformed T-cell lines were CD4⁺CD8⁺ (SP), CD4⁺ (C91PL, MT-4, MT-2, and HuT-102), and CD8⁺ (FC36.22), and uninfected T-cells were CD4⁺CD8⁺ (Molt-4 and Sup-T1) and CD4⁺ (CEM, Jurkat and HuT-78) (supplemental Table S4). Interestingly, Bfl-1 mRNA and proteins were detected in all HTLV-1-infected T-cell lines regardless of their phenotype but not in uninfected T-cell lines, except very moderate mRNA levels in HuT-78 (Fig. 1, A and B). Note that Bfl-1 expression was observed in IL-2-dependent (SP and FC36.22) and -independent (MT-4, MT-2, HuT-102, and C91PL) HTLV-1-infected T-cells (Fig. 1, A and B). We also compared the expression of Bcl-x_L and Bcl-2 in these T-cell lines. In agreement with previous reports (52, 53), we observed that Bcl-2 and Bcl-x_L messengers and proteins were expressed at different levels in both uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines (supplemental Fig. S1, A and B). The presence of HTLV-1 was confirmed by the expression of Tax and HBZ (Fig. 1, A and B, and supplemental Fig. S1A). Altogether, these data show that, in contrast to Bcl-2 and Bcl-x_L, Bfl-1 expression is restricted to HTLV-1-infected CD4⁺CD8⁺, CD8⁺, and CD4⁺ T-cells.

We then examined the expression of a Bfl-1 protein in PBMC from three healthy donors and four ATLL samples. Although healthy PBMC expressed between 25 and 46% of CD3⁺CD4⁺ T-cells, all PBMC from ATLL patients exhibited more than 70% of CD3⁺CD4⁺ T-cells (supplemental Table S5). As expected, only the CD4⁺ ATLL cells showed an activated phenotype. Interestingly, Bfl-1 protein was detected in two acute aggressive ATLL cells but not in two chronic indolent ATLL cells and in healthy control cells (Fig. 1C and supplemental Table S1).

Tax Activates *bfl-1* Gene Transcription in T-cells—To determine the molecular mechanism of Bfl-1 induction by HTLV-1, we first focused on Tax protein, which is known to be involved in T-cell survival. We used JPX-9 cells, a Jurkat subclone that carries the *tax* gene under the control of the inducible metallothionein promoter. Treatment of JPX-9 cells with CdCl₂ induced *tax* mRNA levels within 12 h, and *tax* expression persisted until 48 h (Fig. 2A). We observed that *bfl-1* transcript levels were significantly induced only 24 h post-treatment with CdCl₂ and further increased with time. These results indicated that *tax* expression preceded that of *bfl-1* and that the presence of *bfl-1* correlated with that of *tax*. Then we measured *bfl-1* mRNA expression in human primary CD4⁺ T-cells. We observed that CD4⁺ T-cells expressing *tax* mRNA after transduction expressed higher levels of *bfl-1* mRNA, compared with

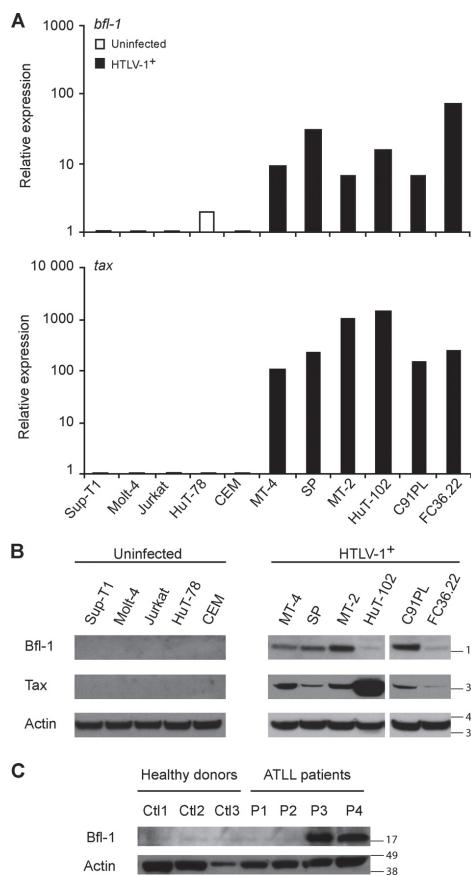


FIGURE 1. Antiapoptotic Bfl-1 transcript and protein are expressed in HTLV-1-infected T-cell lines but not in uninfected leukemic T-cell lines. A, relative expression of specific *bfl-1* and *tax* mRNA was normalized using housekeeping genes after real time RT-PCR of uninfected (Sup-T1, Molt-4, Jurkat, HuT-78, and CEM) and HTLV-1-infected (MT-4, SP, MT-2, HuT-102, C91PL, and FC36.22) T-cell lines. B, expression of Bfl-1 and Tax proteins in uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines was determined by Western blotting. The loading control was the housekeeping actin protein. Results are from one representative experiment of two to three. C, expression of Bfl-1 protein in human PBMC from healthy controls (Ctl 1–3), chronic (P1–2), and acute (P3–4) ATLL patients were determined by Western blotting. The loading control was the housekeeping actin protein.

untransduced T-cells (Fig. 2B). Note that untransduced T-cells and Tax-transduced CD4⁺ T-cells expressed similar levels of *bfl-1* mRNA to uninfected HuT-78 and HTLV-1-infected MT-2 and C91PL CD4⁺ T-cells, respectively (Figs. 1A and 2B).

To further demonstrate that Tax activates *bfl-1* gene expression, we knocked down the expression of Tax using the lentivirus-based vector pLL3.7 expressing Tax-specific shRNA in stably Tax-expressing E12 T-cell clone. Tax shRNA induced more than 80 and 60% of inhibition of *tax* and *bfl-1* mRNA expression, respectively, compared with Ctl shRNA (Fig. 2C). Thus, these data indicate that Tax induces *bfl-1* gene expression in T-cells.

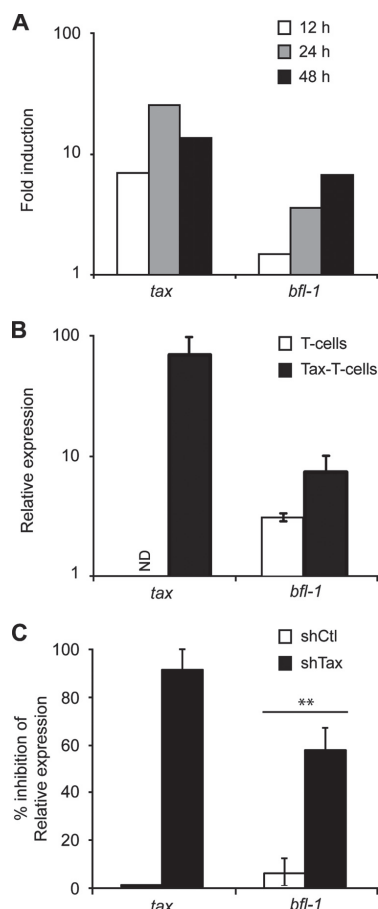
Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

FIGURE 2. *bfl-1* gene is transcriptionally activated by Tax in human T-cells. *A*, expression of *tax* and *bfl-1* messengers in JPX-9 cells at different times post-treatment with 20 μ M CdCl₂. The relative expression of specific *tax* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes after real time RT-PCR. Data are presented as fold induction by comparison with untreated cells, where relative expression was arbitrarily set up to one. Results are from one representative experiment of two. *B*, expression of *bfl-1* transcript in primary T-cells and Tax-expressing T-cells derived from transduced PBMC by real time RT-PCR. The relative expression of *tax* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes. Results are expressed as means $\pm$ S.D. of three independent experiments. ND, not determined. *C*, expression of *tax* and *bfl-1* messengers after knockdown of Tax in E12 T-cell clone. Cells were transduced with lentivirus expressing Luc-Ctl (*ShCtl*) or Tax (*ShTax*) shRNA. After 5 days, the relative expression of specific *tax* and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes after real time RT-PCR. The results are presented as percent of inhibition of *tax* and *bfl-1* expression compared with untransduced T-cell clone. The bars represent the means $\pm$ S.D. of three to four independent experiments. *t* test has been performed between Ctl and Tax shRNA-transduced T-cells (0.001 < *p* value < 0.01).

Tax trans-Activates the Transcription of *bfl-1* Gene via the Canonical NF- κ B Pathway—As Tax trans-activates the expression of numerous genes via the NF- κ B pathway (20), and as *bfl-1* promoter contains NF- κ B-binding sites (38, 50, 67), we then investigated the role of the NF- κ B pathway in Tax-mediated

bfl-1 transcription (Fig. 3). HeLa cells were transfected with expressing vectors encoding for either WT Tax (Tax-WT), Tax-M47 (Δ CREB/ATF), or Tax-M22 (Δ NF- κ B) mutants (Fig. 3A). The *tax* and *bfl-1* mRNA levels were then measured by real time RT-PCR (Fig. 3B). Although mRNA levels of Tax-WT and Tax mutants were quite similar (Fig. 3B, left panel), only Tax-WT and Tax-M47 mutant efficiently induced *bfl-1* mRNA expression (Fig. 3B, right panel). By contrast, Tax-M22 mutant induced only a weak *bfl-1* mRNA expression, suggesting that NF- κ B pathway is involved.

To further confirm the involvement of the NF- κ B pathway in Tax-mediated *bfl-1* transcription, we used the dominant-negative I κ B α S32A/S36A (I κ B α DN) mutant construct that prevents the phosphorylation and thus the degradation of I κ B α , an inhibitor of the canonical pathway. HeLa cells were co-transfected with empty- or Tax-expressing vectors, *bfl-1*-luciferase promoter plasmid (Bfl-1-Luc), and increasing amounts of I κ B α DN-expressing vectors. As shown in Fig. 3C, overexpression of I κ B α DN resulted in a dose-dependent reduction of the Tax-mediated *bfl-1* promoter activation (Fig. 3C, upper panel). Expression of I κ B α and Tax proteins was confirmed by immunoblotting (Fig. 3C, lower panel). We observed that I κ B α DN was unable to totally inhibit the Tax-mediated *bfl-1* promoter activation even when over 100 ng of I κ B α DN-expressing vector were transfected (Fig. 3C, upper panel, and data not shown). By contrast, I κ B α DN completely inhibited Tax-mediated NF- κ B-responsive promoter when used at 25 ng (supplemental Fig. S2, left panel). As expected, I κ B α DN had no effect on HTLV-1-LTR trans-activation by Tax (supplemental Fig. S2, right panel), showing that this inhibitor was specific to the NF- κ B pathway. Finally, we analyzed the effect of I κ B α DN on *bfl-1* messenger expression mediated by Tax. HeLa cells were co-transfected with Tax-WT- and I κ B α DN-expressing vectors, and *bfl-1* transcript levels were measured by real time RT-PCR. Overexpression of I κ B α DN resulted in a 70% inhibition of the Tax-mediated endogenous *bfl-1* mRNA expression (Fig. 3D).

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

c-Jun and JunD Cooperate with Tax to Activate *bfl-1* Gene Transcription—Previous reports showed that the Tax-M22 mutant, deleted for its NF- κ B binding ability, was also unable to activate the AP-1-responsive promoter (68). Furthermore, the *bfl-1* promoter contains AP-1-binding sites (50, 67). Therefore, we tested whether AP-1 may also be involved in trans-activation of the *bfl-1* promoter by Tax. We first investigated the role of AP-1 transcription factors on the activation of *bfl-1* gene expression by performing luciferase reporter assays. Co-transfection of HeLa cells with either JunB, c-Jun, or JunD, and *bfl-1*-luciferase promoter-expressing vectors showed that both c-Jun and JunD activated the *bfl-1* promoter in a dose-dependent manner, although JunB did not (supplemental Fig. S3). We next analyzed the potential cooperation between either Tax and c-Jun or Tax and JunD using suboptimal amounts of AP-1-

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

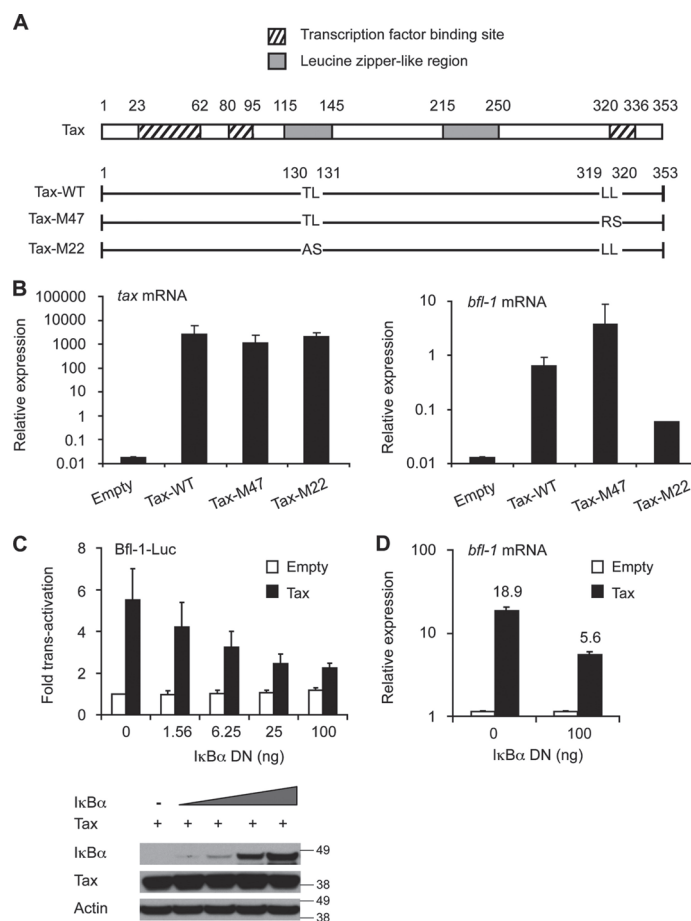


FIGURE 3. Tax trans-activates *bfl-1* gene via the canonical NF-κB pathway. *A*, schematic diagram of wild type Tax of HTLV-1 and its mutants (Tax-M47 and Tax-M22) used in this study. Specific mutations interrupting the transcriptional pathways are indicated, Tax-M47 (L319R/L320S, ΔCREB) and Tax-M22 (T130A/L131S, ΔNF-κB). Tax is composed of transcription factor binding sites and leucine zipper-like regions. The numbers shown indicate amino acid positions. *B*, effect of Tax-WT, Tax-M47, and Tax-M22 on the expression of endogenous *bfl-1* transcripts. Empty vector, Tax-WT, Tax-M22, or Tax-M47 expression vectors (0.3 μg) were transfected into HeLa cells. After 2 days, the relative expression of *tax* (left panel) and *bfl-1* (right panel) mRNAs was normalized using housekeeping gene by real time RT-PCR. Results are expressed as means ± S.D. of three independent experiments. *C*, effect of IκBαDN on Tax-mediated activation of the *bfl-1* promoter. Upper panel, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μg), with pRL-TK-Ruc (0.1 μg) plasmids, with increasing amounts of IκBαDN (1.56–100 ng) and with empty or Tax-WT (0.3 μg) expression vectors. After 2 days, luciferase activity was normalized to TK-Ruc. Normalized luciferase values were expressed as trans-activation (*n*-fold) over control empty vector. The bars represent the means ± S.D. of three independent experiments. Lower panel, protein levels for IκBα and Tax in lysates of HeLa samples were determined by Western blotting. β-Actin was used as a loading control. *D*, effect of IκBαDN on Tax-mediated endogenous *bfl-1* mRNA expression. HeLa cells were co-transfected with IκBαDN (100 ng) and empty or Tax-WT (0.3 μg) expression vectors. After 2 days, the relative expression of *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping gene by real time RT-PCR. Results are expressed as means ± S.D. of triplicates.

expressing vectors. Interestingly, overexpression of Tax with c-Jun or JunD resulted in an increased activity of the *bfl-1* promoter activity in a dose-dependent manner, compared with Tax, c-Jun, or JunD alone (Fig. 4, *A* and *B*, upper panels). Immunoblotting experiments confirmed the expression of Tax, c-Jun, or JunD proteins in transfected HeLa cells (Fig. 4, *A* and *B*, lower panels). To corroborate these results in T-cells, the Jurkat T-cell line was nucleofected with the *bfl-1* promoter expressing vector and empty-, Tax-, and c-Jun- or JunD-expressing vec-

tors. As expected, we observed that Tax cooperated with c-Jun or JunD in Jurkat T-cells to activate the *bfl-1* promoter (data not shown). We next examined the cooperation of Tax with either c-Jun or JunD on endogenous *bfl-1* gene expression. For that purpose, HeLa cells were co-transfected either with Tax- and c-Jun-expressing or Tax- and JunD-expressing vectors, and *bfl-1* mRNA expression was evaluated by real time RT-PCR. We observed that *bfl-1* gene transcription was highly increased in cells co-expressing Tax and c-Jun or Tax and JunD as com-

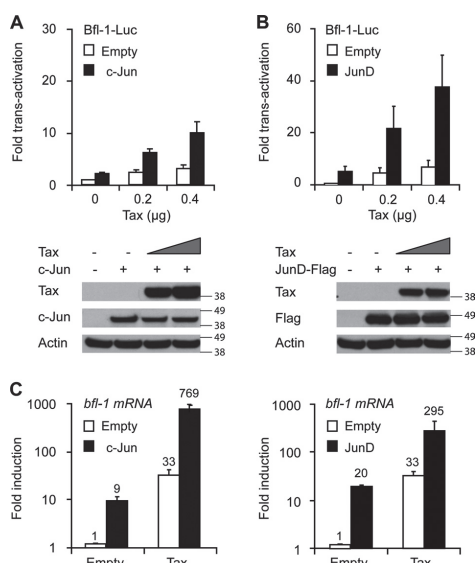
Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

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

pared with cells expressing only Tax, c-Jun, or JunD (Fig. 4C). Thus, these results show for the first time that Tax acts synergistically either with c-Jun or JunD to trans-activate the *bfl-1* gene.

HBZ Regulates Jun-induced *bfl-1* Promoter Activation via Both Activation and Basic Leucine Zipper Domains—As HBZ modulates gene expression via c-Jun and JunD (29, 57, 58, 69), we assessed on the ability of HBZ viral protein to regulate *bfl-1* gene activation. We first analyzed the role of HBZ on the activation of *bfl-1* gene expression by performing luciferase reporter assays. Co-transfection of HeLa cells with HBZ-expressing vector (Fig. 5A) and *bfl-1*-luciferase promoter plasmid showed that HBZ was unable to activate the *bfl-1* promoter, whatever the amount of HBZ expressing vector used (Fig. 5, B and C, upper panels). We next analyzed the potential effect of HBZ on c-Jun- or JunD-mediated *bfl-1* promoter activation

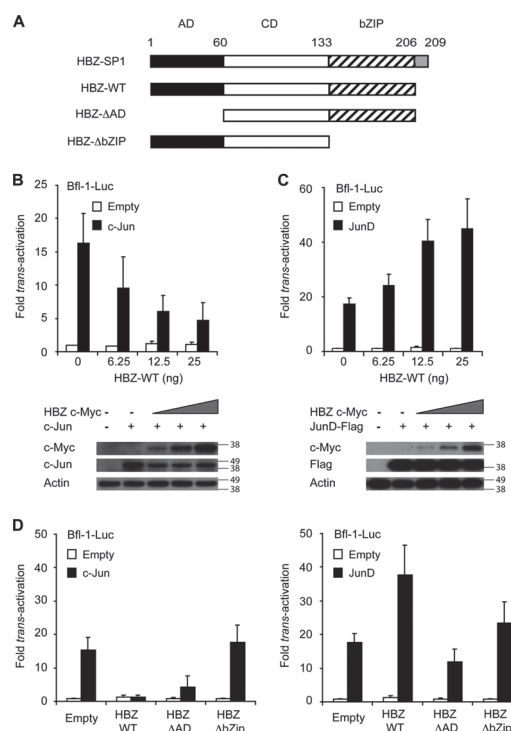


FIGURE 5. HBZ modulates Jun-mediated *bfl-1* promoter activation via both activation and leucine zipper domains. *A*, schematic diagram of full-length HBZ (HBZ-WT) and its mutants (HBZ-ΔAD and HBZ-ΔbZIP) used in this study. HBZ is composed of an N-terminal activation domain (AD), a central domain (CD), and a C-terminal bZIP. The numbers shown indicate amino acid positions. Δ, deletion. *B*, HBZ inhibits c-Jun-mediated activation of the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μg) and pRL-TK (0.1 μg) plasmids and either with increasing amounts of WT HBZ (6.25–25 ng) or c-Jun (25 ng). Luciferase activity was normalized and presented as in Fig. 3. Results are expressed as means ± S.D. of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for WT HBZ and c-Jun in lysates of HeLa samples were determined by Western blotting. β-Actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *C*, HBZ synergizes with JunD to activate the *bfl-1* promoter. *Upper panel*, HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μg) and pRL-TK (0.1 μg) plasmids and either with increasing amounts of WT HBZ (6.25–25 ng) or JunD (25 ng) expression vectors. Luciferase activity was normalized and presented as in Fig. 3. Results are expressed as means ± S.D. of three independent experiments. *Lower panel*, protein levels for WT HBZ and JunD in lysates of HeLa samples were determined by Western blotting. β-Actin was used as a loading control. Results are from one representative experiment of two. *D*, both activation and leucine zipper are required for full HBZ activities. HeLa cells were co-transfected with Bfl-1-Luc promoter (0.3 μg) and pRL-TK (0.1 μg) plasmids and either with HBZ (WT, ΔAD, ΔbZIP, 25 ng), or c-Jun (25 ng, left panel) or JunD (25 ng, right panel) expressing vectors alone or with HBZ (WT, ΔAD, ΔbZIP) plus c-Jun or HBZ (WT, ΔAD, ΔbZIP) plus JunD expressing vectors. After 2 days, luciferase activity was normalized and presented as in Fig. 3. Results are expressed as means ± S.D. of three independent experiments.

using optimal amounts (25 ng) of Jun-expressing vectors. Interestingly, overexpression of HBZ inhibited c-Jun-mediated activation of the *bfl-1* promoter in a dose-dependent manner (Fig. 5B, upper panel). By contrast, overexpression of HBZ with JunD resulted in the amplification of JunD-mediated *bfl-1* promoter

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

activation in a dose-dependent manner (Fig. 5C, upper panel). Immunoblotting experiments confirmed the expression of HBZ, c-Jun, or JunD in transfected HeLa cells (Fig. 5, B and C, lower panels).

We further examined the role of activation domains and bZIP domains in HBZ modulating Jun-induced *bfl-1* promoter activation, using the well characterized HBZ mutants (HBZ-ΔAD and -ΔbZIP) (Fig. 5A). Vectors expressing HBZ-WT or its deleted forms and the *bfl-1* promoter were transiently co-transfected into HeLa cells with or without c-Jun- or JunD-expressing vectors. As shown in Fig. 5D, HBZΔAD partially repressed c-Jun-mediated *bfl-1* promoter activation, whereas HBZΔbZIP was unable to do so (left panel). By contrast, HBZΔAD was unable to enhance JunD-mediated *bfl-1* promoter activation, whereas HBZΔbZIP had no significant effect on JunD-mediated *bfl-1* promoter trans-activation (Fig. 5D, right panel).

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

NF-κB, c-Jun, and JunD Binding Activity to the *bfl-1* Promoter in T-cells—We have shown that Tax induced *bfl-1* gene activation via both NF-κB and AP-1 pathways and that HBZ modulates Jun-mediated *bfl-1* promoter activity. To determine the resulting activity of both Tax and HBZ on the endogenous expression of *bfl-1* transcripts, we measured *bfl-1* mRNA levels by real time RT-PCR in the E12 cells, a clone derived from Jurkat T-cells that stably express Tax and HBZ, and in C8166-45 T-cells carrying but not expressing the HTLV-1 viral proteins, except Tax and HBZ. As shown in Fig. 6A, both E12 and C8166-45 T-cells expressed a high level of *tax* and a low level of *hbz* transcripts. More interestingly, *bfl-1* is highly expressed in these T-cells (Fig. 6A), suggesting that Tax may have a dominant-positive effect when its expression is higher than that of HBZ.

We next determined whether Tax and/or HBZ are responsible for NF-κB and/or AP-1 binding to respective consensus elements in the proximal part of the *bfl-1* promoter. EMSA was performed with double-stranded oligonucleotides representing the NF-κB at position -52 and AP-1 elements at positions -104 or -74. Consistent with the luciferase assays, protein complexes bound to both NF-κB (Fig. 6B, lane 2) and AP-1 (Fig. 6B, lanes 6 and 10 for AP-104 and AP74, respectively) sites were detected with nuclear extracts from E12 T-cell clone. The specificity of DNA-protein complexes in extracts was determined by competition studies with unlabeled competitors. As expected, cold κB52, AP-104, and AP74 double-stranded oligonucleotides efficiently competed with their homologously labeled probes and decreased binding of nuclear extracts in a dose-dependent manner (Fig. 6B, lanes 3 and 4 for κB52, lanes 7 and 8 for AP-104, and lanes 11 and 12 for AP74). Then, the exact composition of the transcription factor DNA-protein complexes in E12 T-cell clone was ascertained using antibody supershifting EMSA. Supershift analyses were performed on agarose gels to achieve a better resolution of the antibody-protein-DNA complexes. Antibodies against p65/RelA, c-Rel,

RelB, p100/p52, and p105/p50 all induced a supershift of the DNA-protein complexes using the κB52 site of the *bfl-1* gene as probe (Fig. 6C, lanes 2–6, respectively) with a variable degree of shift depending on the antibody used. Antibodies against c-Jun and JunD induced a supershift of complexes formed with either an AP-104 or AP-74 DNA-binding site (Fig. 6C, lanes 8 and 9 and 11 and 12, respectively). Note that isotype controls were unable to induce supershift, demonstrating the specificity of interactions between NF-κB and AP-1 with the *bfl-1* promoter (data not shown). Taken together, our data indicate that NF-κB, c-Jun, and JunD proteins bind to the proximal part of the κB and AP-1 elements of the *bfl-1* promoter in E12 T-cells expressing Tax, HBZ, and Bfl-1. Moreover, these results suggest that both canonical and alternative NF-κB pathways are involved in the κB binding activity of the *bfl-1* promoter.

Bfl-1 Is Involved in HTLV-1-infected T-cell Survival—We finally asked whether Bfl-1 participates in the survival of HTLV-1-infected T-cell lines. As the impact of the antiapoptotic Bcl-2 proteins in HTLV-1-infected T-cell survival has never been studied, we also compared the involvement of Bfl-1 to that of the antiapoptotic Bcl-2 or Bcl-x_L proteins. We thus knocked down the expression of these proteins using a lentivirus-based vector pLL3.7 that co-expressed specific shRNA and GFP as reporter genes, thus permitting transduced cells to be tracked by flow cytometry. After 5–7 days of infection, the transduction efficiency of uninfected (Jurkat) and HTLV-1-infected (C91PL and MT-4) T-cell lines ranged from 87 to 98% (data not shown). Bcl-2, Bcl-x_L, and Bfl-1 silencing by the specific shRNAs was confirmed by immunoblotting (Fig. 7A). We observed that Bcl-x_L and Bfl-1 knockdown induced a moderate death of C91PL T-cells (Fig. 7B, middle panel) with only 20 and 40% of cell death detected in C91PL cells transduced with Bcl-x_L and Bfl-1 shRNA, respectively, suggesting that Bfl-1 expression may offset the Bcl-x_L knockdown and conversely. In contrast, we observed that MT4 T-cells were highly sensitive to Bfl-1 silencing, whereas cell death resulting from Bcl-x_L knockdown never exceeded 25% after 7 days in these cells (Fig. 7B, right panel). Finally, Ctl or Bcl-2 shRNA did not induce significant death in transduced C91PL and MT-4 T-cells, and the viability of uninfected Jurkat T-cells was not altered by any shRNA tested (Fig. 7B). Altogether, these data directly involve Bfl-1, but also Bcl-x_L, in the survival of HTLV-1-transformed T-cell lines.

HTLV-1-infected T-cell Survival Is Fully Compromised by Combination of Bfl-1 Knockdown and ABT-737 Treatment—As Bcl-x_L and Bfl-1 knockdown induced, respectively, only 20 and 40% of cell death in C91PL (Fig. 7B), we assessed whether targeting both Bfl-1 and Bcl-x_L proteins might compromise C91PL cell survival. Among the small compounds that target Bcl-2 antiapoptotic proteins, ABT-737 has been described to specifically block Bcl-2, Bcl-x_L, and Bcl-w activity, but not Bfl-1 and Mcl-1 activity (66). We first explored survival of the C91PL T-cell line after ABT-737 exposure. ABT-737 caused death of C91PL T-cells in a concentration-dependent manner (Fig. 8A). As a control and in agreement with a previous report (70), Jurkat T-cells were poorly sensitive to ABT-737 (data not shown). We then combined treatment with ABT-737 and Bfl-1 shRNA. Interestingly, Bfl-1 knockdown resulted in

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

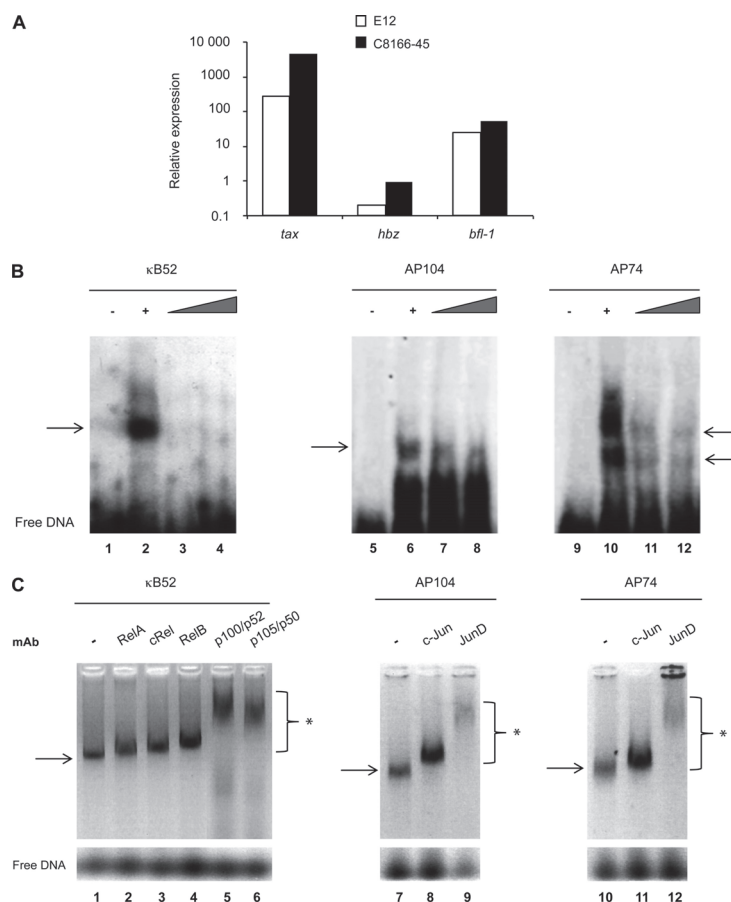


FIGURE 6. Constitutive activation of NF-κB, c-Jun, and JunD in E12 T-cell clone expressing both Tax and HBZ. *A*, expression of *bfl-1* transcript in stably Tax/HBZ-expressing Jurkat cells (E12) and in HTLV-1-infected C8166-45 T-cell line expressing only Tax and HBZ by real time RT-PCR. The relative expression of specific *tax*, *hbz*, and *bfl-1* mRNA was normalized using housekeeping genes. Results are from one representative experiment of three. *B*, increase of NF-κB and AP-1 binding activities in nuclear extracts from E12 T-cell clone. Labeled *bfl-1* promoter containing the NF-κB (κB52 probe, left panel) and AP-1 (AP-104 and AP-74 probes, middle and right panels)-binding sites were incubated alone (lanes 1, 5, and 9, respectively) or with 100 ng of nuclear extract (lanes 2–4, 6–8, and 10–12) in EMSA reactions. Specificity of the DNA-protein complex formation at the NF-κB and AP-1 sites in competition EMSA; 100 and 200 ng of cold κB52 (lanes 3 and 4), AP-104 (lanes 7 and 8), and AP-74 (lanes 11 and 12) oligonucleotides were added as competitors. Free probes are indicated at the bottom of the gels. Specific protein-DNA complexes are indicated by arrows. *C*, NF-κB- and AP-1-binding complexes were recognized by specific mAbs. Nuclear extracts from E12 T-cell clone were preincubated without (indicated as –) or with the mAbs indicated on top of each lane, before adding the κB52 (left panel), AP-104 (middle panel), and AP-74 (right panel) probes to the binding mixture. Free DNA is indicated at the bottom of the gels. Supershifted bands are indicated by brace plus *. Results are from one representative experiment of three.

complete sensitization of C91PL T-cells to ABT-737 treatment (Fig. 8B). Such cell death was not observed in C91PL cells transduced with Bfl-1 shRNA plus DMSO or with Ctl shRNA plus ABT-737. As a negative control, Bfl-1 knockdown did not significantly induce cell death of ABT-737-treated Jurkat T-cell line (data not shown).

Thus, our data demonstrate for the first time that Bfl-1 expression confers resistance of the HTLV-1-infected C91PL T-cell line to ABT-737 treatment, and the data suggest that the concurrent up-regulation of both Bfl-1 and Bcl-x_L can synergize to induce survival of HTLV-1-infected T-cell lines.

HTLV-1-infected T-cell Survival Is Compromised by Combination of Bfl-1 Knockdown and Etoposide Treatment—As acute aggressive ATLL cells were resistant to chemotherapeutic agents (71), we further determined whether expression of Bfl-1 could be associated with resistance to drugs such as etoposide. We first explored viability of the C91PL T-cell line after exposure to etoposide for 48 h. Etoposide caused death of C91PL T-cells in a concentration-dependent manner (Fig. 8C), with a maximum of 60% of dead cells, even for concentrations higher than 1.5 μM (data not shown). We next assessed whether Bfl-1 silencing affected etoposide-induced apoptosis of HTLV-1-

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

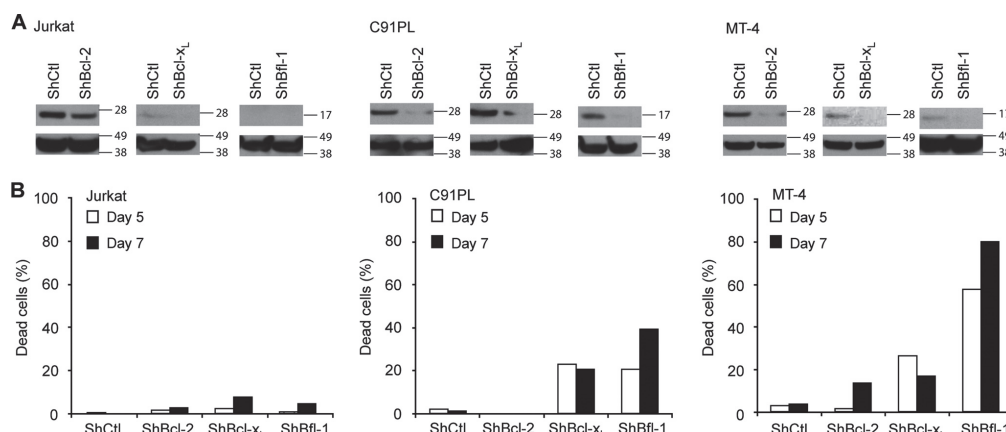


FIGURE 7. Down-regulation of Bfl-1 expression induced spontaneous HTLV-1-infected T-cell death. Cells were transduced with lentivirus expressing Luc-Ctl, Bcl-2, Bcl-x_L, or Bfl-1 shRNA. A, after 5 days, the knockdown of Bcl-2, Bcl-x_L, or Bfl-1 by the specific shRNA in transduced Jurkat, C91PL, and MT-4 T-cell lines was controlled by Western blotting using specific mAbs against Bcl-2, Bcl-x_L, or Bfl-1, respectively (upper panels). Comparable protein loading was confirmed using a mAb specific for the housekeeping β -actin protein (lower panels). B, percent of dead cells (PI⁺) was measured by flow cytometry 5–7 days post-transduction. Results are from one representative experiment of three to five.

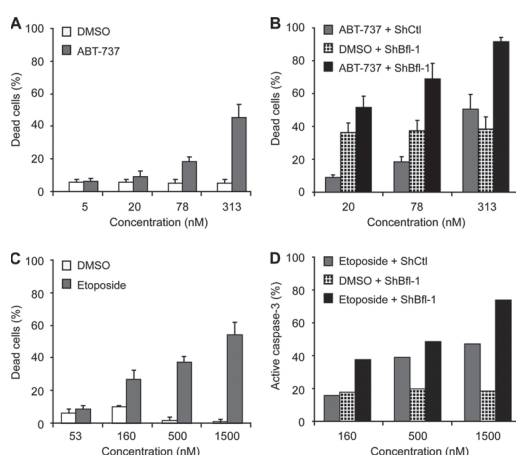


FIGURE 8. Knockdown of Bfl-1 by shRNA sensitizes HTLV-1-infected C91PL T-cells to ABT-737- or etoposide-induced apoptosis. A, effect of ABT-737 on HTLV-1-infected C91PL T-cell death. Cells were treated with different concentrations of vehicle (DMSO) or ABT-737. After 2 days, percentages of cell death (PI⁺) were measured by flow cytometry. Results are expressed as means $\pm$ S.D. of three independent experiments. B, C91PL cells were transduced with Bfl-1 or scramble Bfl-1 Ctl shRNA and 5 days later exposed to different concentrations of DMSO or ABT-737 for 2 additional days. Cell death was assessed by PI staining and measured by flow cytometry. Results are expressed as means $\pm$ S.D. of three independent experiments. C, effect of etoposide on HTLV-1-infected C91PL T-cell death. Cells were treated with different concentrations of vehicle (DMSO) or etoposide. After 2 days, the percentages of cell death were measured as in A. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. D, C91PL cells were transduced with Bfl-1 or scramble Bfl-1 Ctl shRNA and 5 days later were exposed to different concentrations of etoposide for 2 additional days. Apoptosis was assessed by anti-active caspase-3 Ab staining and measured by flow cytometry. Results are from one representative experiment of two.

infected C91PL T-cells. C91PL cells were first transduced with Ctl or Bfl-1 shRNA. After 5 days, cells were treated with various concentrations of etoposide for 48 h, and the percentage of apoptotic cells, determined with anti-active caspase 3 Ab, was measured by flow cytometry. As shown in Fig. 8D, Bfl-1 shRNA, but not Ctl shRNA, efficiently increased sensitivity to etoposide. Such an effect is not observed in the presence of DMSO (Fig. 8D). Altogether, these data demonstrate a role for Bfl-1 in resistance to etoposide-induced apoptosis of HTLV-1-infected T-cells.

DISCUSSION

The role of the antiapoptotic Bfl-1 and Bcl-x_L proteins in tumor survival and chemoresistance to current drugs has been documented (72). ATLL development is a multistep oncogenic process, which affects among others cellular functions, proliferation, and cell survival. The outcome of aggressive ATLL remains very poor because HTLV-1-infected cells are resistant to most conventional chemotherapy. Understanding the impact of antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family on HTLV-1-infected T-cell survival may provide clues for the development of new therapeutic strategies. Although the expression of Bcl-2 and Bcl-x_L antiapoptotic proteins has been extensively documented in HTLV-1-infected T-cell lines and in ATLL cells, the role of Bfl-1 has never been described. Here, we showed the following: (i) HTLV-1-infected T-cells express Bfl-1 protein, whereas uninfected leukemia/lymphoma T-cells do not; (ii) the regulatory viral Tax protein induces Bfl-1 expression through both NF- κ B and AP-1 pathways, whereas the HBZ protein modulates AP-1-induced Bfl-1 expression; and (iii) Bfl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, are involved in the survival of HTLV-1-infected T-cells.

The first link between HTLV-1 infection and the deregulation of *bfl-1* expression was revealed by gene expression profile experiments indicating that *bfl-1* gene is significantly up-regu-

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

lated in PHA/IL-2-stimulated HTLV-1-infected human peripheral blood T-cells, compared with stimulated uninfected T-cells (73). Reinforcing this observation, our results, based on the analysis of six HTLV-1-infected and five uninfected T-cell lines, indicate that Bfl-1 expression is restricted to HTLV-1-infected T-cell lines. Interestingly, we also observed Bfl-1 protein expression in two acute ATLL cells, but not in two chronic ATLL cells. Such results suggest that Bfl-1 expression might be related to the aggressive status of acute ATLL associated with a poor prognosis and multidrug resistance, although the chronic ATLL is considered as an indolent subtype (71). However, more samples need to be studied to definitively demonstrate overexpression of Bfl-1 in aggressive ATLL cells.

More and more studies point out the growing complexity of the mechanisms regulating viral Tax and HBZ protein expression and their impact in leukemogenesis (see reviews in Refs. 14, 21, 28). According to our first observation in primary thymocytes (74), we found here that Tax alone up-regulates endogenous *bfl-1* in primary mature T-cells, indicating that Bfl-1 expression in HTLV-1-infected T-cells is at least Tax-dependent. Our data show unequivocally that Tax-mediated Bfl-1 expression occurs in part through the NF- κ B pathway, involving both the canonical and alternative pathways. Supporting the involvement of NF- κ B in HTLV-1-mediated T-cell survival, we and others observed that Bay11-7082, an inhibitor of the canonical NF- κ B pathway, partly down-regulates Bcl-x_L (75) and Bfl-1 (our work), and partially induced cell death in HTLV-1-infected T-cell lines (data not shown). These observations support the hypothesis that signaling pathways, other than the NF- κ B pathway, are involved in overexpression of the antiapoptotic Bfl-1 protein. We showed that JunD and c-Jun, but not JunB, potentially activate the *bfl-1* promoter and stimulate endogenous expression of *bfl-1*. Jun members are responsible for the expression of genes involved in cell proliferation, survival, and T-cell transformation (76, 77). Although Tax is able to activate the expression and to increase the activity of JunD, c-Jun, c-Fos, and Fra-1/2 *in vitro* (20, 78–80), only JunD seems to be constitutively activated in ATLL cells (27, 78). We report here that JunD or c-Jun synergized with Tax to activate *bfl-1* transcription. We observed both c-Jun and JunD binding activities in two sites of the proximal part of the *bfl-1* promoter in E12 T-cell clone highly expressing Tax. Altogether, these data demonstrate for the first time that NF- κ B and AP-1 members mediate Tax-induced Bfl-1 expression. Thus, we propose that both NF- κ B and AP-1, especially JunD, transcription factors, are involved in Tax-mediated antiapoptotic activity through the up-regulation of the *bfl-1* protein. In keeping with such a hypothesis, we observed that knockdown of Tax down-regulates *bfl-1* expression and induces death of the E12 T-cell clone expressing both Tax and HBZ (data not shown). These findings are in agreement with previous observations showing that the mouse CTLL-2 T-cells expressing the Tax mutant defective for its ability to activate both NF- κ B and AP-1 (Tax-M22) were unable to survive in the absence of IL-2, in contrast to cells expressing Tax-WT (79, 81).

Although Tax plays an important role in the initiation to leukemogenesis, HBZ seems to rather maintain the tumoral phenotype of ATLL cells. Numerous studies showed that HBZ

modulates NF- κ B and AP-1 pathways to enhance proliferation of HTLV-1-infected T-cells in the late stages of ATLL (for review see Ref. 28). The present data demonstrate that HBZ is unable to *trans*-activate the *bfl-1* gene in T-cells and that it inhibits Tax-mediated *bfl-1* *trans*-activation. Supporting our observation, Zhi *et al.* (82) reported that HBZ decreases Tax-mediated NF- κ B activation. Zhao *et al.* (83) indicated a selective suppression of the canonical NF- κ B pathway by HBZ, which interacts with the p65 subunit of NF- κ B, thus preventing its DNA binding activity and inducing its degradation through a proteasome-dependent pathway. However, HBZ-mediated repression of the canonical NF- κ B pathway is not efficient when Tax is overexpressed (19, 83, 84). HBZ has also been described to modulate gene expression, especially hTERT, depending on its Jun partner (29). Here, we report that ectopic expression of HBZ inhibits c-Jun-mediated *bfl-1* gene activation and enhances *bfl-1* promoter activity induced by JunD in transfected cells. We also showed that Bfl-1 is highly expressed in T-cell lines, which constitutively express a low level of HBZ and a high level of Tax, supporting the notion that Tax seems to be the major inducer of Bfl-1, compared with HBZ, when Tax is highly expressed. However, we cannot exclude that other viral proteins may regulate Bfl-1 expression. For example, accessory p30¹¹ protein of HTLV-1 is known to modulate apoptotic pathways, by regulating the transcriptional activity of NF- κ B and AP-1 (85). In agreement with this hypothesis, we found no correlation between the expression of Tax and/or HBZ and that of Bfl-1 in HTLV-1-infected T-cell lines.

Finally, our results directly implicate both Bfl-1 and Bcl-x_L in the survival of HTLV-1-infected T-cell lines and support the hypothesis that these two antiapoptotic proteins may be crucial for the extended survival of (pre-)leukemic T-cells. Similarly to what was previously observed by us and others in B lymphomas (47, 86), silencing of the Bfl-1 antiapoptotic protein induces significant cell death of HTLV-1-infected T-cells in a caspase-dependent manner. In agreement with the model proposed by Certo *et al.* (87), our observation suggests that inhibition of Bfl-1 antiapoptotic protein by itself, either by down-regulating its expression or through interaction with BH-3-only proteins or BH3 mimetics, may be sufficient to provoke cell apoptosis.

Drugs used in ATLL treatment, such as the NF- κ B inhibitor Bay11-7082, suppress Bfl-1 and Bcl-x_L expression and induce apoptosis of HTLV-1-infected T-cell lines (data not shown). Other drugs, such as arsenic trioxide, have also been shown to induce down-regulation of Bcl-x_L, but not that of Bcl-2, and apoptosis in HTLV-1-infected T-cell lines and in *ex vivo* ATLL cells (88). Apoptosis of tumor cells can be triggered by small compounds that mimic BH3-only proteins and target antiapoptotic Bcl-2 proteins (70). However, ABT-737, which targets Bcl-2, Bcl-x_L and Bcl-w (66), does not induce an efficient *in vitro* apoptosis of ATLL cells expressing at least one member of the Bcl-2 family, such as Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, and Mcl-1 (89). The low sensitivity of ATLL cells to ABT-737-induced apoptosis may indeed be explained by overexpression of Mcl-1, but also Bfl-1, because both proteins are known to be involved in ABT-737 resistance (90–93). In agreement with such a hypothesis, we demonstrate that down-regulation of Bfl-1 expression by shRNA strategy sensitizes the HTLV-1-infected C91PL T-cell

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

line to ABT-737 treatment. Taken together, our results implicate Bfl-1 and Bcl-x_L as crucial regulators of the extended survival of leukemic T-cells in the context of HTLV-1 infection. A previous report indicates that anti-apoptotic activity of Bcl-x_L contributes to chemotherapeutic drug resistance of acute ATLL cells (89). To date, the role of Bfl-1 in resistance to conventional chemotherapeutic agents has only been demonstrated in B-cell malignancies (47, 86, 94). In this study, we show for the first time that Bfl-1 silencing increases etoposide-induced caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-infected T-cells. But, etoposide treatment in combination with ABT-737 (89) or with Bfl-1 silencing (our work) shows no synergistic effect, suggesting that both Bfl-1 and Bcl-x_L may be simultaneously targeted to restore strong chemosensitivity of HTLV-1-infected T-cells. Taken together, these data indicate that these two antiapoptotic proteins may be considered as potential therapeutic targets in T-cell malignancy associated with HTLV-1.

Acknowledgments—We are grateful to F. Bex, B. Barbeau, E. Wattel, A. Cottalorda, N. Merindol, L. Schaeffer, M. Wencker, and D. Walls for helpful discussions. We thank F. Duchamp, E. Combe, and J. Aubin for technical assistance. We acknowledge the contribution of the facilities (Flow Cytometry, BSL3, CelluloNet, Protein Analysis Platform, and Genetic and Vectorology Analysis) of UMS344/US8 Biosciences Gerland-Lyon Sud (IFR128) and their respective staffs. We also thank I. Grojean from CelluloNet facility for technical advice regarding security procedures of HTLV-1-infected T-cell lines propagated in BSL3 facility.

REFERENCES

- Cavrois, M., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Plumelle, Y., and Wattel, E. (1996) Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* **88**, 4646–4650
- Etoh, K., Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. (1997) Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo*. *Cancer Res.* **57**, 4862–4867
- Li, M., and Green, P. L. (2007) Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **142**, 159–168
- Franchini, G., Wong-Staal, F., and Gallo, R. C. (1984) Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6207–6211
- Sugamura, K., Fujii, M., Kannagi, M., Sakitani, M., Takeuchi, M., and Hinuma, Y. (1984) Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int. J. Cancer* **34**, 221–228
- Furukawa, Y., Osame, M., Kubota, R., Tara, M., and 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
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A., and Ramstedt, U. (1992) Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.* **66**, 4570–4575
- Grossman, W. J., Kimata, J. T., Wong, F. H., Zutter, M., Ley, T. J., and Ratner, L. (1995) Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1057–1061
- Bellon, M., Baydoun, H. H., Yao, Y., and Nicot, C. (2010) HTLV-1 Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* **115**, 2441–2448
- Robek, M. D., and 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. *J. Virol.* **73**, 4856–4865
- Pozzatti, R., Vogel, J., and Jay, G. (1990) The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 413–417
- Nerenberg, M., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G., and Jay, G. (1987) The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* **237**, 1324–1329
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M. J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W. W. (2006) Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* **12**, 466–472
- Journo, C., Douceron, E., and Mahieux, R. (2009) HTLV gene regulation. Because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol.* **4**, 425–440
- Ishikawa, C., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M., and Mori, N. (2011) Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* **32**, 110–119
- Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K. T. (2005) Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**, 5976–5985
- Zane, L., Sibon, D., Legras, C., Lachuer, J., Wierinckx, A., Mehlen, P., Delfau-Larue, M. H., Gessain, A., Gout, O., Pintel, C., Lançon, A., Moretux, F., and Wattel, E. (2010) Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8⁺ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* **407**, 341–351
- Taylor, J. M., and Nicot, C. (2008) HTLV-1 and apoptosis. Role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* **13**, 733–747
- Silbermann, K., and Grassmann, R. (2007) Human T cell leukemia virus type 1 Tax-induced signals in cell survival, proliferation, and transformation. *Signal Transduction* **7**, 34–52
- Hall, W. W., and Fujii, M. (2005) Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* **24**, 5965–5975
- Chlichlia, K., and Khazaie, K. (2010) HTLV-1 Tax. Linking transformation, DNA damage, and apoptotic T-cell death. *Chem. Biol. Interact.* **188**, 359–365
- Fujita, M., and Shiku, H. (1995) Differences in sensitivity to induction of apoptosis among rat fibroblast cells transformed by HTLV-I tax gene or cellular nuclear oncogenes. *Oncogene* **11**, 15–20
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006) HTLV-1 basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 720–725
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004) Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* **109**, 559–567
- Usui, T., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Murata, K., Hasegawa, H., Yamada, Y., and Kamihira, S. (2008) Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* **5**, 34
- Nagakubo, D., Jin, Z., Hieshima, K., Nakayama, T., Shirakawa, A. K., Tanaka, Y., Hasegawa, H., Hayashi, T., Tsukasaki, K., Yamada, Y., and Yoshie, O. (2007) Expression of CCR9 in HTLV-1⁺ T-cells and ATL cells expressing Tax. *Int. J. Cancer* **120**, 1591–1597
- Nakayama, T., Hieshima, K., Arao, T., Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A. K., Yamada, Y., Fujii, M., Oiso, N., Kawada, A., Nishio, K., and Yoshie, O. (2008) Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene* **27**, 3221–3232
- Matsuoka, M. (2010) HTLV-1 bZIP factor gene. Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Mol. Aspects Med.* **31**, 359–366
- Kuhlmann, A. S., Villaudy, J., Gazzolo, L., Castellazzi, M., Mesnard, J. M., and Duc Dodon, M. (2007) HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* **4**, 92

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

30. Satou, Y., Yasunaga, J., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P. L., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Ono, M., Sakaguchi, S., and Matsuoka, M. (2011) HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* **7**, e1001274
31. Hagiya, K., Yasunaga, J., Satou, Y., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2011) ATF3, an HTLV-1 bZIP factor-binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* **8**, 19
32. Arnold, J., Zimmermann, B., Li, M., Lairmore, M. D., and Green, P. L. (2008) Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, *Hbz*, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* **112**, 3788–3797
33. White, E. (2006) Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **13**, 1371–1377
34. Postigo, A., and Ferrer, P. E. (2009) Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes Infect.* **11**, 1071–1078
35. Polster, B. M., Pevsner, J., and Hardwick, J. M. (2004) Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 211–227
36. Adams, J. M., and Cory, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337
37. Kirkin, V., Joos, S., and Zörnig, M. (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 229–249
38. Zong, W. X., Edelstein, L. C., Chen, C., Bash, J., and Gélinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 382–387
39. Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1999) NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5923–5929
40. Simonian, P. L., Grillot, D. A., and Nuñez, G. (1997) Bcl-2 and Bcl-X_L can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* **90**, 1208–1216
41. Schneider, T. J., Grillot, D., Foote, L. C., Núñez, G. E., and Rothstein, T. L. (1997) Bcl-x protects primary B-cells against Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **159**, 4834–4839
42. Olsson, A., Norberg, M., Okvist, A., Derkow, K., Choudhury, A., Tobin, G., Celsing, F., Osterborg, A., Rosenquist, R., Jondal, M., and Osorio, L. M. (2007) Up-regulation of *bfl-1* is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Cancer* **97**, 769–777
43. Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999) NF- κ B-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9136–9141
44. Lam, L. T., Davis, R. E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottel, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., and Staudt, L. M. (2005) Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* **11**, 28–40
45. Grumont, R. J., Rourke, I. J., and Gerondakis, S. (1999) Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B-cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 400–411
46. Chen, C., Edelstein, L. C., and Gélinas, C. (2000) The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x_L. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2687–2695
47. Brien, G., Trescol-Biemont, M. C., and Bonnefoy-Bérard, N. (2007) Down-regulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B-cells to apoptosis. *Oncogene* **26**, 5828–5832
48. de la Fuente, C., Wang, L., Wang, D., Deng, L., Wu, K., Li, H., Stein, L. D., Denny, T., Coffman, F., Kehn, K., Baylor, S., Maddukuri, A., Pumfery, A., and Kashanchi, F. (2003) Paradoxical effects of a stress signal on pro- and anti-apoptotic machinery in HTLV-1 Tax-expressing cells. *Mol. Cell Biochem.* **245**, 99–113
49. D'Souza, B., Rowe, M., and Walls, D. (2000) The *bfl-1* gene is transcriptionally up-regulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J. Virol.* **74**, 6652–6658
50. D'Souza, B. N., Edelstein, L. C., Pegman, P. M., Smith, S. M., Loughran, S. T., Clarke, A., Mehl, A., Rowe, M., Gélinas, C., and Walls, D. (2004) Nuclear factor κ B-dependent activation of the antiapoptotic *bfl-1* gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J. Virol.* **78**, 1800–1816
51. Portis, T., and Longnecker, R. (2004) Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* **23**, 8619–8628
52. Nicot, C., Mahieux, R., Takemoto, S., and Franchini, G. (2000) Bcl-X_L is up-regulated by HTLV-1 and HTLV-II *in vitro* and *in vivo* ATLL samples. *Blood* **96**, 275–281
53. Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and 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- κ B and c-AMP-responsive element-binding protein pathways. *Virus Genes* **22**, 279–287
54. Smith, M. R., and Greene, W. C. (1990) Identification of HTLV-1 tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev.* **4**, 1875–1885
55. Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A., and Mahieux, R. (2004) A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 Tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* **279**, 43307–43320
56. Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R. B., and Bex, F. (2005) Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF- κ B activation by the human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10391–10406
57. Thébaud, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C., and Mesnard, J. M. (2004) HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **562**, 165–170
58. Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J. M. (2003) The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 43620–43627
59. Sun, S., Elwood, J., and Greene, W. C. (1996) Both amino- and carboxyl-terminal sequences within I κ B α regulate its inducible degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1058–1065
60. Meertens, L., Pise-Masison, C., Quere, N., Brady, J., Gessain, A., and Mahieux, R. (2004) Utilization of the CBP but not the p300 co-activator by human T-lymphotropic virus type-2 Tax for p53 inhibition. *Oncogene* **23**, 5447–5458
61. Hivin, P., Frédéric, M., Arpin-André, C., Basbous, J., Gay, B., Thébaud, S., and Mesnard, J. M. (2005) Nuclear localization of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J. Cell Sci.* **118**, 1355–1362
62. Nagata, K., Ohtani, K., Nakamura, M., and Sugamura, K. (1989) Activation of endogenous *c-fos* proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax protein in the human T-cell line, Jurkat. *J. Virol.* **63**, 3220–3226
63. Lemasson, I., Robert-Hebmann, V., Hamaia, S., Duc Dodon, M., Gazzolo, L., and Devaux, C. (1997) Transrepression of *lck* gene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax. *J. Virol.* **71**, 1975–1983
64. Chung, H. K., Young, H. A., Goon, P. K., Heidecker, G., Princler, G. L., Shimoza, O., Taylor, G. P., Bangham, C. R., and Derse, D. (2003) Activation of interleukin-13 expression in T-cells from HTLV-1-infected individuals and in chronically infected cell lines. *Blood* **102**, 4130–4136
65. Cottalorda, A., Verschelde, C., Marçais, A., Tomkowiak, M., Musette, P., Uematsu, S., Akira, S., Marvel, J., and Bonnefoy-Bérard, N. (2006) TLR2 engagement on CD8 T-cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1684–1693
66. Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., and Rosenberg, S. H. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumors. *Nature* **435**, 677–681
67. Edelstein, L. C., Lagos, L., Simmons, M., Tirumalai, H., and Gélinas, C. (2003) NF- κ B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on

Tax of HTLV-1 Mediates T-cell Survival via Bfl-1 and Bcl-x_L

- the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2749–2761
68. Peloponese, J. M., Jr., and Jeang, K. T. (2006) Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **281**, 8927–8938
 69. Matsumoto, J., Ohshima, T., Isono, O., and Shimotohno, K. (2005) HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* **24**, 1001–1010
 70. Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2009) Bcl-2 inhibitors. Small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ.* **16**, 360–367
 71. Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J. C., Harrington, W., Jr., O'Mahony, D., Janik, J. E., Bittencourt, A. L., Taylor, G. P., Yamaguchi, K., Utsunomiya, A., Tobinai, K., and Watanabe, T. (2009) *J. Clin. Oncol.* **27**, 453–459
 72. Vogler, M. (2012) BCL2A1. The underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ.* **19**, 67–74
 73. Harhaj, E. W., Good, L., Xiao, G., and Sun, S. C. (1999) Gene expression profiles in HTLV-1-immortalized T-cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* **18**, 1341–1349
 74. Villaudy, J., Wencker, M., Gadot, N., Gillet, N. A., Scoazec, J. Y., Gazzolo, L., Manz, M. G., Bangham, C. R., and Dodon, M. D. (2011) HTLV-1 propels thymic human T-cell development in "human immune system" Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice. *PLoS Pathog.* **7**, e1002231
 75. Mori, N., Yamada, Y., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Tsukasaki, K., Tanaka, Y., Tomonaga, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2002) Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-κB and induces apoptosis of HTLV-1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **100**, 1828–1834
 76. Shaulian, E. (2010) AP-1-The Jun proteins. Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell. Signal.* **22**, 894–899
 77. Eferl, R., and Wagner, E. F. (2003) AP-1. A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 859–868
 78. Mori, N., Fujii, M., Iwai, K., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Hata, T., Yamada, Y., Tanaka, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2000) Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **95**, 3915–3921
 79. Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2001) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T-cells. *Virology* **279**, 38–46
 80. Fujii, M., Iwai, K., Oie, M., Fukushi, M., Yamamoto, N., Kannagi, M., and Mori, N. (2000) Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T-cells infected with human T-cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 1603–1606
 81. Iwanaga, Y., Tsukahara, T., Ohashi, T., Tanaka, Y., Arai, M., Nakamura, M., Ohtani, K., Koya, Y., Kannagi, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (1999) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein abrogates interleukin-2 dependence in a mouse T-cell line. *J. Virol.* **73**, 1271–1277
 82. Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y. L., Ho, Y. K., Shih, H. M., and Giam, C. Z. (2011) NF-κB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* **7**, e1002025
 83. Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009) Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-κB. *Blood* **113**, 2755–2764
 84. Matsuoka, M., and Jeang, K. T. (2011) Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation. Viral infectivity, Tax, HBZ, and therapy. *Oncogene* **30**, 1379–1389
 85. Bindhu, M., Nair, A., and Lairmore, M. D. (2004) Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T-cell activation, and cellular gene expression. *Front. Biosci.* **9**, 2556–2576
 86. Morales, A. A., Olsson, A., Celsing, F., Osterborg, A., Jondal, M., and Osorio, L. M. (2005) High expression of *bfl-1* contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer* **113**, 730–737
 87. Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., and Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**, 351–365
 88. Mahieux, R., Pise-Masison, C., Gessain, A., Brady, J. N., Olivier, R., Perret, E., Misteli, T., and Nicot, C. (2001) Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1- and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. *Blood* **98**, 3762–3769
 89. Ishitsuka, K., Kunami, N., Katsuya, H., Nogami, R., Ishikawa, C., Yotsu-moto, F., Tanji, H., Mori, N., Takeshita, M., Miyamoto, S., and Tamura, K. (2011) Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma. *In vitro* and *in vivo* effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* **317**, 218–225
 90. Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., and Grant, S. (2007) Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res.* **67**, 782–791
 91. van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., Willis, S. N., Scott, C. L., Day, C. L., Cory, S., Adams, J. M., Roberts, A. W., and Huang, D. C. (2006) The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**, 389–399
 92. Yecies, D., Carlson, N. E., Deng, J., and Letai, A. (2010) Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* **115**, 3304–3313
 93. Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R. J., Sun, X. M., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2009) Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 4403–4413
 94. Cheng, Q., Lee, H. H., Li, Y., Parks, T. P., and Cheng, G. (2000) Up-regulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-κB inhibition. *Oncogene* **19**, 4936–4940

SUPPLEMENTAL DATA

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

Héloïse Macaire^{1, 2, 3#}, Aurélien Riquet^{1, 2, 3#}, Vincent Moncollin^{3, 4}, Marie-Claude Biéumont-Trescol^{1, 2, 3}, Madeleine Duc Dodon^{1, 3, 5}, Olivier Hermine⁶, Anne-Laure Debaud^{1, 2, 3}, Renaud Mahieux^{1, 3, 5}, Jean-Michel Mesnard⁷, Marlène Pierre^{1, 2, 3}, Louis Gazzolo^{1, 3, 5}, Nathalie Bonnefoy^{1, 2, 3}, and Hélène Valentin^{1, 2, 3*}

From the ¹Université de Lyon, France; ²INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France; ³Université Lyon 1, UMS3444/US8, France; ⁴LBMC, UMR5239 CNRS/ENS, 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69007; ⁵INSERM, U758, ENS-Lyon, 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69007, France; ⁶CNRS, UMR8603, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, Paris, F-75015, France; ⁷CPBS/CNRS/UMR5236, 1919 Route de Mende, Montpellier, F-34060, France; ⁸Hospices Civils de Lyon, France

Supplemental Methods

The clinical status of ATLL patients, the sequences of RT-PCR and shRNA primers are summarized in Table S1, S2 and S3, respectively

Table S1. Clinical features of ATLL patients at time of sample collection

Patients	Clinical type	Native country	WBC count (mm3)
P1	Chronic	Ivory coast	5,200
P2	Chronic	Mali	35,000
P3	Acute	French Guyana	25,000
P4	Acute	West indies	200,000

WBC indicates white blood cells; ATLL cells include abnormal cells

Table S2. List of primers used for real time RT-PCR

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

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

Table S3. Target sequences of shRNAs

Gene Name	Sequence
<i>Ctl luc</i>	CTTACgCTgAgTACTTCgA
<i>tax</i>	gCCTTCCTCACCgAATgTTC
<i>bcl-2</i>	AACCgggAgATAgTgATgAAg
<i>bcl-x_L</i>	AggATACAgCTggAgTCA
<i>bfl-1 (bcl-2/A1)</i>	AAggAgTTTgAAgACggCATC
<i>Ctl bfl-1*</i>	AAggTCACAgATAgATTggC

* Ctl Bfl-1 corresponds to scrambled sequence from Bfl-1

Supplemental Data

Phenotypic analysis of HTLV-1-infected T-cell lines and ATLL cells are summarized in Table S4 and S5, respectively

Table S4. Phenotype of uninfected and HTLV-1-infected human T-cell lines

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

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

^b MFI corresponds to mean of fluorescence intensity

Data are shown as mean of three to five separate experiments

SD were below 20%

Table S5. Phenotypic analysis of PBMC from healthy donors and ATLL patients after thaw

Type of cells ^a	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%) ^b	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%) ^b	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%) ^b
Ctl 1	25	15.5	2
Ctl 2	46	13	1
Ctl 4	42.5	26	2
P1	71	18	63
P2	92	2	87
P3	95	1	69
P4	98	2	95

^a Ctl and P correspond to PBMC from control healthy donors and ATLL patients, respectively.

^b Double stainings were performed to identify the percent of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ T-cells and activated CD4⁺ T-cells by flow cytometry.

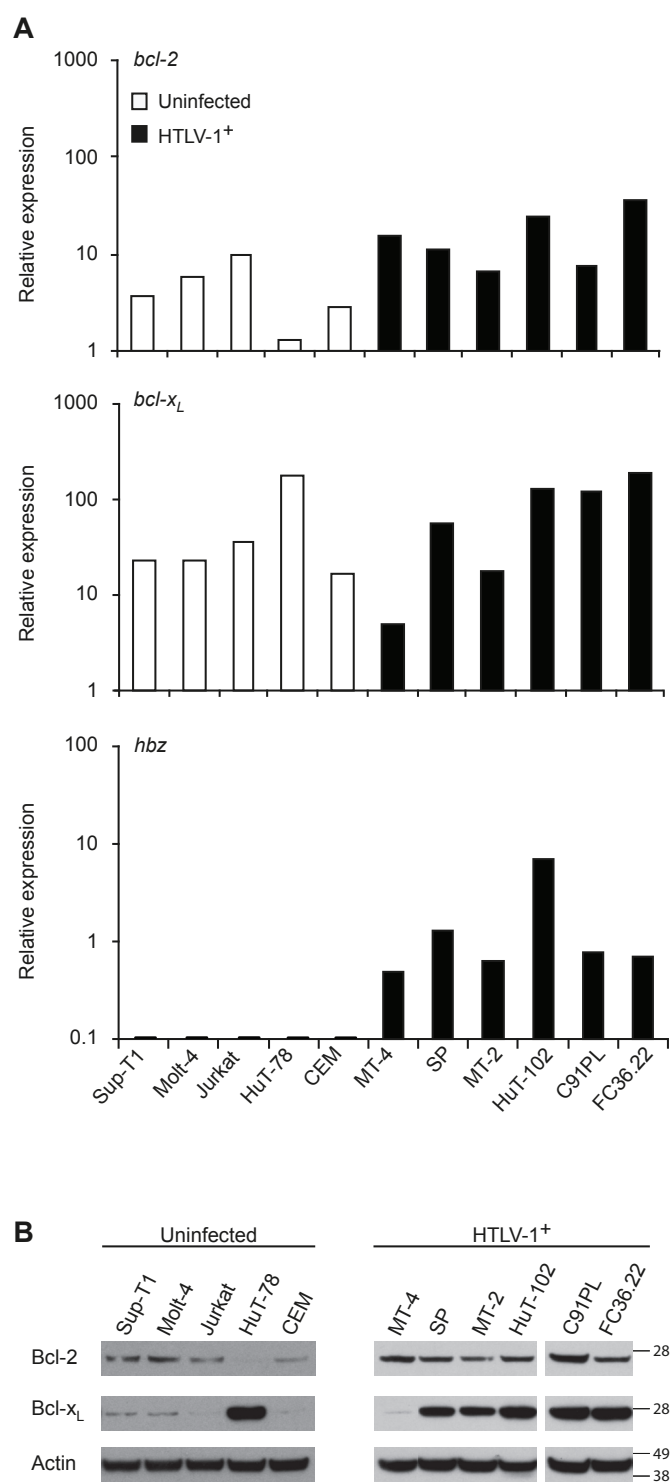
Supplemental Figure legends

Supplemental Figure 1. **Expression of Bcl-2, Bcl-x_L, HTLV-1 Tax and HBZ in human uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines.** *A*, Relative expression of the specific *bcl-2*, *bcl-x_L* and *hbz* mRNA was normalized using housekeeping gene after real-time RT-PCR. *B*, Protein levels for Bcl-2 and Bcl-x_L in uninfected (Sup-T1, Molt-4, Jurkat, HuT-78 and CEM) and HTLV-1-infected (MT-4, SP, MT-2, HuT-102, C91PL and FC36.22) T-cell lines were determined by Western blotting. The loading control was the housekeeping actin protein. Results are from one representative experiment of two to three.

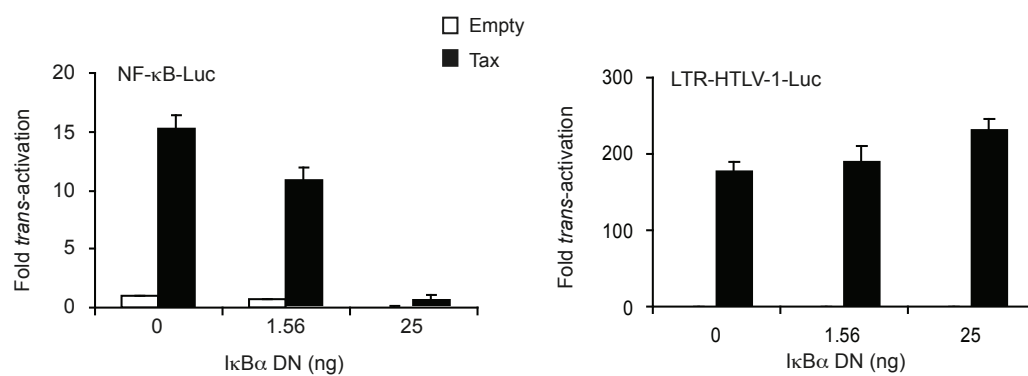
Supplemental Figure 2. **Effect of IκBαDN on Tax-mediated activation of the NF-κB promoter.** HeLa cells were co-transfected with either NF-κB-Luc or 5'LTR-HTLV-1-Luc promoter (0.3 μg) and pRL-TK-Ruc (0.1 μg) plasmids, and different amounts of IκBαDN (1.56 and 25 ng), and either empty or Tax-WT (0.3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

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

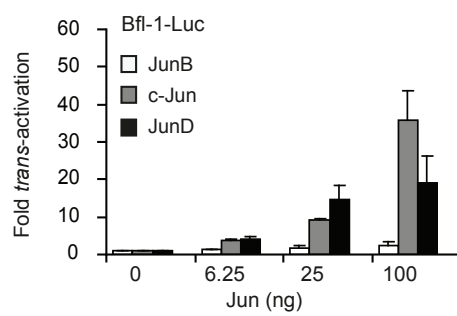
Supplemental Figure S1

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

Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3



Conclusion et perspectives

1. Implication de AID dans les dommages à l'ADN induit par Tax dans les LT CD4⁺.

1.1. Edition de l'ADN génomique par AID dans les LT CD4⁺ infectés par HTLV-1

Au cours de ce projet nous avons pu confirmer les résultats obtenus par Ishikawa (Ishikawa et al., 2011) et les étendre dans des modèles plus physiopathologiques. Nous avons en effet confirmé l'expression de AID dans des LT CD4⁺ primaires infectés par HTLV-1 ainsi que dans des LT CD4⁺ issus de rate de souris NSG infectées par HTLV-1.

L'avancée majeure de ce travail est la preuve que AID est fonctionnelle dans ces cellules et est capable d'éditer l'ADN génomique. En effet l'utilisation de techniques basés sur le FRET ou la spectrométrie de masse nous ont permis de démontrer que AID était capable de désaminer les dCs *in vitro* et ainsi d'augmenter le taux d'uracile *in vivo* dans l'ADN génomique. Ces données montrent pour la première fois un rôle mutagène de AID dans les cellules infectées par HTLV-1.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique de cette thèse, AID fait partie de la famille AID/APOBEC. Chez l'homme cette famille comprend 11 membres possédant tous une activité cytidine déaminase (Conticello, 2008). Différentes études ont démontré qu'au delà de leur rôle dans le système immunitaire, certains APOBEC3, tels que A3A et A3B étaient capable d'éditer l'ADN génomique. Notamment un rôle de ces enzymes a été mis en évidence dans l'accumulation de mutations dans différents cancer comme le cancer du sein ainsi que dans des B-CLL (Burns et al., 2013a, 2013b; Mussil et al., 2013; Rebhandl et al., 2014; Roberts et al., 2013; Suspene et al., 2011). Ces données nous ont poussés à nous assurer que l'édition du génome était bien le fruit de l'activité de AID et non d'un autre APOBEC. Nous avons donc testé l'expression des transcrits des différents APOBEC dans les LT CD4⁺ infectés ou non par HTLV-1 ainsi que dans les Molt-4 exprimant ou non Tax. Nos résultats démontrent que A3C, A3D/E, A3F et A3G semble exprimés en réponse à l'infection par HTLV-1 ou à l'expression de Tax. En revanche aucune expression de A3A ou A3B n'a été observée. Ces résultats confortent l'idée que la désamination

observée dans les cellules HTLV-1⁺ serait bien spécifique de l'expression de AID. Cependant nous avons détecté une expression de A3C en réponse à l'infection de HTLV-1 et bien qu'aucune implication dans le développement

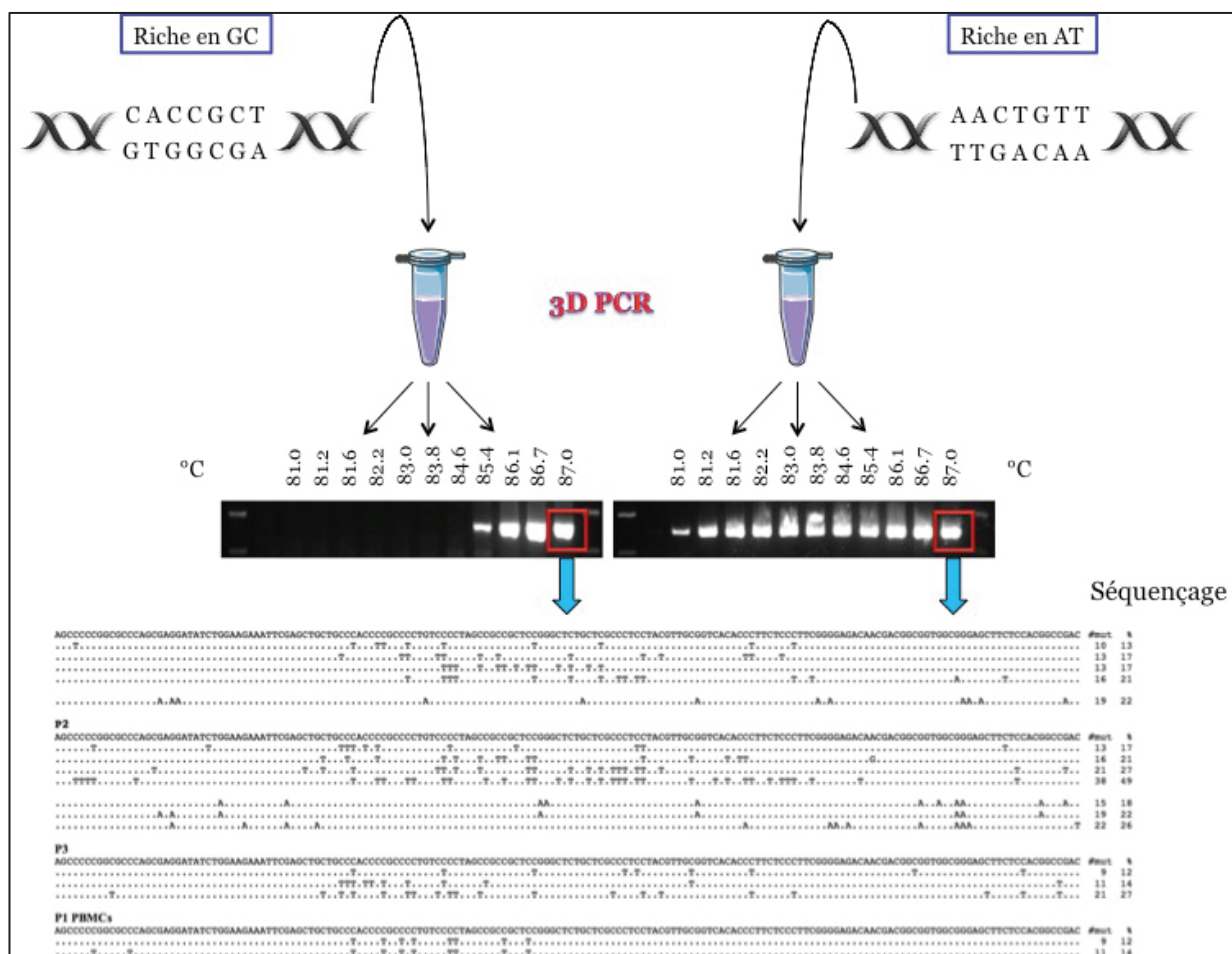


Figure 25 : Principe de la Technique de 3D PCR. La technique de 3D (Differential DNA Denaturation) PCR se base sur les différences de température de dénaturation existant entre les paires de bases A:T et G:C. Plus le fragment d'ADN à amplifier est riche en G:C plus la température de dénaturation est élevée. Cette technique est donc très appropriée pour observer l'action cytidine déaminase des membres de la famille AID/APOBEC. L'action de ces enzymes peut, en effet, substituer les dCs par des dGs, dAs ou dTs. La diminution progressive de la température de dénaturation va permettre de comparer un échantillon de référence avec un échantillon mis en présence d'un membre de la famille AID/APOBEC et ainsi de constater si la température de dénaturation est plus faible dans le deuxième cas, indiquant que le pourcentage de G:C a diminué en faveur du pourcentage de A:T. Si une différence de température de dénaturation est observée, un séquençage est alors effectuée afin de localiser et identifier les mutations générée sur ce fragment d'ADN. Il est à noter que cette technique nécessite de cibler certains gènes au préalable. Images extraites de (Suspene et al., 2011).

n'ait été décrite à ce jour, il faut noter que l'expression de A3C est à la fois cytoplasmique et nucléaire et que A3C désamine les dCs sur de l'ADNsb. Nous ne pouvons pas donc pas écarter l'hypothèse d'une action mutagène de A3C sur le génome des cellules HTLV-1+. Il serait donc opportun de réaliser des tests complémentaires afin de savoir si A3C peut participer à l'édition du génome des cellules infectées.

Afin de confirmer que AID est capable d'éditer le génome des cellules infectées et de générer des mutations, nous avons au travers d'une collaboration avec Jean-Pierre Vartanian, utilisé la technique de 3D PCR (Differential DNA Denaturation PCR). Cette technique exploite les différences de température de dénaturation qui existent entre les brins riches en GC de ceux riches en AT. Plus le brin est riche en GC et plus la température de dénaturation doit être élevée. Cette technique est donc très utile pour observer l'activité déaminase des AID/APOBEC sur un échantillon de référence, qui AID va induire des transitions C→T et ainsi augmenter le pourcentage de AT au dépend de celui de GC. Ainsi la température de dénaturation sera plus faible que dans l'échantillon contrôle (Figure 25). Afin de réaliser cette technique il est indispensable de choisir des séquences de gènes que l'on veut amplifier par PCR. Une fois les séquences analysées par 3D PCR, les séquences présentant une modification du taux de AT sont séquencées pour observer la présence de mutations signature de l'enzyme étudiée (Figure 25). Pour notre projet nous avons choisi de cibler des exons des gènes p53, c-Myc, p16 ou encore Tax, cependant aucune différence significative n'a pu être obtenue (données non montrées). Ceci peut être due à la technique elle-même qui nécessite de choisir certains gènes et de cibler des séquences d'environ 200pb le plus souvent dans les exons. Il est ainsi possible de passer à côté de mutations en ne choisissant pas le bon gène ou la bonne séquence. De plus il faut atteindre un nombre de mutations suffisant pour sortir du bruit de fond généré par la polymérase, ce qui implique que le taux de mutations doit être élevé lorsque l'on utilise la 3D PCR. Dans notre cas le séquençage en whole genome apporterait une réponse plus fiable quant à la présence de mutations signature de AID dans le génome des cellules infectées.

Une autre dimension à prendre en compte ici est le fond génétique des cellules. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, seul 5% des personnes infectées développent une pathologie et il a été suggéré que le développement de l'ATL nécessite au préalable l'inactivation de gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire comme p21, p27 ou encore p53. On peut donc envisager que pour pouvoir observer une accumulation de mutations signature de AID avec la technique de 3D PCR, il faudrait se placer dans des cellules déficientes pour ces protéines. La solution la plus simple pour tester cette hypothèse serait peut-être d'inactiver certains gènes codant pour des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire par utilisation d'ARN interférence et d'analyser ensuite le profil de mutations des cellules infectées.

L'ATL met entre 30 et 50 ans à se déclarer suggérant un long processus de transformation. Ce paramètre pourrait également expliquer la difficulté à mettre en évidence une accumulation de mutations induites par AID dans des délais de seulement quelques semaines. Le modèle murin NSG utilisé au cours de ce projet développe des lymphomes T au bout de quelques semaines. Ce modèle de développement accéléré de la pathologie fournirait une bonne alternative à nos modèles *in vitro*. En effet il nous permettrait de récupérer des LT CD4⁺ à différents temps post-infection et d'analyser les mutations générées puis accumulées au cours de la lymphomagenèse. Une autre possibilité que nous aurions aimé explorer est de séquencer des cellules ATL et des LT CD4⁺ sains provenant de différents patients. L'idéal serait d'obtenir des échantillons d'ATL provenant des 4 formes indolentes et agressives afin de savoir si des mutations signature de AID sont retrouvées dans ces ATL et si AID peut être un facteur de mauvais pronostic dans les formes agressives.

1.2. Implication de AID dans les cassures d'ADN et l'instabilité génomique des cellules infectées

En plus de l'édition du génome, nos résultats démontrent que AID est capable d'induire des SSB et DSB au niveau de l'ADN. Ces résultats ont été obtenus *in vitro* sur des cellules primaires infectées. Ces données suggèrent que AID joue un rôle dans l'instabilité génétique et chromosomique caractéristique des cellules ATL. Ces DSB

générées pourrait être à l'origine de délétions, insertions et translocations. Cependant la relevance de ces travaux reste à confirmer *in vivo* dans des cellules infectées par HTLV-1. Nous avons notamment, en collaboration avec Madeleine Duc-Dodon démarré de nouvelles expériences sur les souris NSG. En effet afin de valider le rôle de AID *in vivo* nous voulons inhiber l'expression de AID de manière conditionnelle afin de pouvoir prévenir l'expression de AID à différents stades du développement de la leucémie. Pour ce faire nous proposons de transduire les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ avec des shRNA anti-AID inducibles. Ces études, qui sont en cours, nous permettraient de démontrer définitivement l'implication de AID dans le développement de l'ATL et de voir si l'extinction de cette protéine a un effet sur la progression de la pathologie.

Récemment un papier de Kinjo a décrit une up-régulation de ROS dans les cellules infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax (Kinjo et al., 2010). Dans cette étude les ROS semblent responsables des lésions causées au niveau de l'ADN. Nos résultats montrent quant à eux indiquent que l'enzyme AID joue un rôle dans les endommagements de l'ADN induits au cours de l'infection par HTLV-1. De manière intéressante deux études ont démontré que la déamination spontanée et enzymatique des dCs se fait par oxydation, indiquant que les ROS peuvent servir d'intermédiaire dans ce processus (Labet et al., 2008; Snider et al., 2002). De plus une étude récente suggère que la capacité de p53 à inhiber les translocations chromosomiques et autres altérations dans les lymphocytes B réside dans sa capacité à réduire les lésions induites par AID en diminuant le niveau de ROS dans les cellules (Guikema et al., 2010). Ces données suggèrent que les lésions induites par AID dans les cellules infectées par HTLV-1 pourraient en partie être médiées par les ROS observés par Ishikawa.

1.3. Un rôle de AID dans l'immunogénicité des cellules infectées.

Comme nous l'avons évoqué dans cette thèse, le stress causé par des endommagements de l'ADN induit une réponse de la part de la cellule qui va mettre en place des mécanismes de réparation. Si les dommages sont trop nombreux et/ou apparaissent trop vite, ils ne pourront être réparés et la cellule est normalement éliminée par apoptose ou par le système immunitaire. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse montrent que l'expression de AID induit la désamination du génome et des SSB et DSB. Le marquage γ H2AX montrent que les voies de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN sont activées. Nous avons donc envisagé l'hypothèse que la survie, l'échappement au système immunitaire, la transformation tumorale des cellules infectées serait peut être fonction du niveau d'expression de AID. Une trop forte expression de AID induirait un stress trop intense dans la cellule et induirait l'apoptose ou l'élimination par le système immunitaire. En revanche une expression plus modérée permettrait l'accumulation progressive de lésions, les cellules ayant un seuil de tolérance aux dommages à l'ADN. De manière intéressante, l'analyse en cytométrie de flux a révélé que l'expression de AID dans les cellules infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax était associée à l'expression de ligands de NKG2D (NKG2D-L) tels que ULBP1,2,3 et MICA/B. L'extinction de l'expression de AID par shRNA corrèle à une diminution du niveau d'expression de ces ligands. Les ligands de NKG2D permettent aux cellules NK de reconnaître et d'éliminer les cellules endommagées ou infectées (pour revue (Raulet, 2003)). L'activation des voies de réparation de l'ADN tels que la voie ATM-p53 conduit à l'expression des NKG2D-L (Gasser et al., 2005). Au cours de ce travail de thèse un papier publié dans PLOS Pathogen en 2013 a mis en évidence une surexpression de AID dans des cellules B naïves infectées par le virus KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) (Bekerman et al., 2013). Les auteurs ont démontré que AID était responsable de l'induction de l'expression des NKG2D-L. L'utilisation d'inhibiteurs des voies de réponse aux endommagements de l'ADN a permis d'établir que cette induction passait par l'activation de ces voies.

Ces données vont dans le sens de notre hypothèse. L'expression de AID dans les cellules infectées pourrait induire l'expression des NKG2D-L par le biais des endommagements à l'ADN et ainsi favoriser l'élimination de ces cellules par le

système immunitaire. Afin de valider notre hypothèse, nous devons nous assurer que l'expression des NKG2D-L fait de ces cellules des cibles des cellules NK. Il nous faudra donc tester la réponse cytotoxique des cellules NK vis à vis des cellules T CD4⁺ infectées en co-cultivant les CD4⁺ infectées exprimant ou non AID avec des cellules NK.

Il a été établi que la protéine Tax était très fortement immunogène et activait la réponse CTL. La longue période asymptomatique et le fait que seulement 5% des personnes infectées par HTLV-1 développent une pathologie pourraient s'expliquer par le fait que les cellules infectées exprimant fortement Tax sont éliminées efficacement par le système immunitaire. De manière très intéressante dans 60% des cas, les cellules ATL n'expriment plus ou très peu Tax, suggérant que la diminution de l'expression de Tax permettrait aux cellules d'échapper au système immunitaire et ainsi de persister et d'accumuler des lésions pouvant conduire à l'ATL. Cette perte d'expression de Tax est en grande partie due à l'accumulation de lésions au niveau du gène de Tax et du promoteur viral 5'LTR. Différentes études ont permis de mettre en lumière des mutations non-sens, des insertions et des délétions au niveau du gène de *tax* (Furukawa et al., 2001; Takeda et al., 2004) ainsi que des délétions du 5'LTR (Tamiya et al., 1996). A ce jour les mécanismes précis conduisant à ces dommages ne sont pas connus. La capacité de AID à induire des mutations et des DSB responsables notamment de translocations chromosomiques, de délétions et d'insertions pourrait jouer un rôle dans la perte d'expression du génome viral. Une étude en 2010 a révélé que A3G pouvait éditer le génome de HTLV-1 sous forme de provirus (Fan et al., 2010). Cependant A3G est incapable d'entrer dans le noyau et d'éditer le génome. Partant de nos résultats nous pouvons envisager que AID participerait à l'extinction de l'expression de Tax en induisant des mutations somatiques et des DSB à la fois au niveau du gène de *tax* et du promoteur viral en 5'LTR, permettant ainsi d'échapper à la surveillance par le système immunitaire. Le séquençage du génome viral des cellules ATL n'exprimant plus Tax nous indiquerait si des mutations signature de AID pourraient être à l'origine de la perte d'expression de Tax.

D'après ces deux hypothèses il semblerait que AID puisse avoir deux effets distincts sur l'immunogénicité des cellules infectées. Une forte expression de AID induirait des lésions de l'ADN en grand nombre conduisant à l'expression de ligands

de NKG2D. L'expression de ces ligands couplée à celle de Tax favoriserait l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire. Si ces lésions provoquées par AID touchent le génome viral et inhibent l'expression de Tax, qui l'on suppose induirait à son tour une diminution de l'expression de AID, les cellules infectées pourraient ainsi échapper à la surveillance du système immunitaire.

1.4. Implication de Twist-1 la persistance des dommages à l'ADN et la prolifération des cellules infectées.

En nous appuyant sur les résultats d'un papier rétracté dans Blood qui démontrait l'induction de l'expression de Twist-1 par Tax (Tanji et al., 2010), nous nous sommes intéressé au potentiel rôle de ce facteur de transcription dans l'induction de l'expression de AID et la persistance des dommages à l'ADN. Twist-1 est un facteur de transcription de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) qui joue un rôle central dans l'embryogenèse. Twist-1 est aujourd'hui reconnu comme un puissant oncogène (Maestro et al., 1999; Valsesia-Wittmann et al., 2004). Le rôle proto-oncogénique de Twist-1 s'exerce en outre par sa capacité à inhiber la mort cellulaire induite par p53 (Maestro et al., 1999). Plusieurs études ont montré que Twist-1 est exprimé dans un grand nombre de cancers et était impliqué dans divers processus, comme la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la chimiorésistance, l'angiogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion de cellules tumorales (Cheng et al., 2008; Vernon and LaBonne, 2004)(Vernon et al., 2004 ; Cheng et al., 2008).

Twist-1 étant capable d'activer la voie NF- κ B, nous avons spéculé qu'il pourrait coopérer avec Tax pour induire l'expression de AID voire même de maintenir l'expression de AID en l'absence de Tax dans les ATL. Nous avons confirmé l'expression de Twist-1 dans les cellules MOLT4 transduites avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de Tax et les cellules JPX-9 dans lesquelles l'expression de Tax est induite par un traitement au CdCl₂ ainsi que dans les LT CD4⁺ primaires infectés par HTLV-1 et les LT CD4⁺ de rate de souris NSG infectées. Afin de tester l'impact de Twist-1 sur l'expression de AID, nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux codant pour des shRNA spécifiques de Twist1, dans les Molt-4-Tax ainsi que dans les LT CD4⁺ HTLV-1⁺. L'extinction de l'expression de Twist-1 ne semble pas

affecter l'expression de *aicda*. Cette absence d'effet ne veut pas nécessairement dire que Twist-1 n'est pas capable d'induire l'expression de AID. Dans les cellules exprimant Tax ou infectées par HTLV-1, l'expression de Tax est très forte et peut amplement suffire à l'activation du promoteur de *aicda*. Le rôle de Twist-1 pourrait se situer dans les phases pré-leucémiques où Tax est plus faiblement exprimé voire dans certains cas plus exprimé du tout. Dans ce contexte Twist-1, en activant NF- κ B pourrait maintenir l'expression d'un grand nombre de gène cellulaire dont AID. La surexpression de Twist-1 *in vitro* dans LT CD4⁺ grâce à un vecteur de surexpression permettrait de savoir si Twist-1 est capable d'induire l'expression de AID

Il a également été démontré que Twist-1 était capable d'inhiber la réparation de l'ADN et l'apoptose en bloquant la voie p53 à différents niveaux (Ansieu et al., 2008; Hamamori et al., 1999; Maestro et al., 1999; Shiota et al., 2008; Stasinopoulos et al., 2005). Cette capacité à bloquer p53 pourrait favoriser la persistance des dommages à l'ADN induits par AID et ainsi contribuer à l'instabilité chromosomique des ATL. L'invalidation conditionnelle de Twist-1 dans les cellules de souris NSG infectées par HTLV-1 nous renseignerait sur le rôle de Twist-1 dans la progression de l'ATL.

Un autre rôle de Twist-1 a été suggéré dans l'étude du groupe de Mori. Ils ont en effet démontré que l'extinction de l'expression de Twist-1 par shRNA conduisait à une prolifération réduite des cellules MT-2 (Tanji et al., 2010). Leurs résultats ont d'ailleurs montré que Twist-1 modulait l'expression de YB-1, Akt1, and Akt2, qui sont impliqués dans la prolifération et la survie. Ces facteurs sont notamment impliqués dans la croissance tumorale, la survie, la chimiorésistance, la migration et l'invasion (Cheng et al., 2008; Schitteck et al., 2007; Shiota et al., 2008)(Shitteck et al., 2007 ; Shiota et al., 2008 ; Cheng et al., 2008). L'utilisation de shRNA dirigés contre Twist-1 dans les cellules infectées *in vitro* ou dans les souris NSG nous renseignerait sur l'implication de Twist-1 dans la prolifération cellulaire.

Bien qu'à ce jour aucun rôle de Twist-1 dans le développement de l'ATL n'a été démontré, son formidable potentiel oncogène, laisse penser que Twist-1 pourrait favoriser la persistance des dommages à l'ADN en inhibant la voie p53 et pourrait jouer un rôle crucial dans la prolifération des cellules infectées par HTLV-1.

1.5. Implication de Tax et d'autres facteurs tel que HBZ dans la régulation de l'expression de AID

Au cours de ce projet nous avons confirmé l'implication de la voie classique NF- κ B dans la lignée cellulaire Molt-4. La transduction de ces cellules avec le mutant Tax M22 incapable d'activer NF- κ B n'induit pas l'expression des messagers de *aicda*. Le mutant Tax M22 étant également incapable d'activer la voie AP-1, il n'est pas à exclure que cette voie puisse jouer un rôle dans l'induction de l'expression de AID par Tax. Nos résultats obtenus avec le mutant Tax M47 suggèrent aussi une possible implication du facteur de transcription CREB.

Comme nous l'avons abordé dans cette thèse, l'expression de Tax décroît jusqu'à devenir indétectable dans certaines cellules ATL. La question se pose alors du maintien de l'expression des gènes activés par Tax, notamment AID, ainsi que du phénotype tumoral. Bellon et al., ont démontré que l'immortalisation des cellules primaires par Tax seul est rare et que l'expression de Tax n'est pas suffisante pour induire le switch entre la croissance IL-2-dépendante et la croissance IL-2-indépendante (Bellon et al., 2010). Ce débat, qui se poursuit, a conduit au postulat que Tax est important pour l'initiation de la transformation cellulaire mais suggère que d'autres facteurs, par exemple une autre protéine virale ou des microARNs, seraient responsables de la transformation des cellules infectées par HTLV-1 (Jeang, 2010). Parmi ces protéines, HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper) est récemment devenue une protéine d'un grand intérêt dans l'oncogenèse associée à HTLV-1. HBZ, une protéine virale anti-sens, a été initialement identifiée comme pouvant se fixer à la protéine CREB-2 (un facteur de transcription antisens similaire à CREB) qui inhibe la transcription virale en 5' LTR (Gaudray et al., 2002). De plus différents travaux ont démontré que HBZ pouvait également interagir avec CREB et CBP/p300 et ainsi empêcher leur recrutement au niveau des séquences TxRE et CRE du 5' LTR (Cavanagh et al., 2006; Clerc et al., 2008; Gaudray et al., 2002). HBZ participe donc à l'inhibition de l'expression du génome viral en séquestrant les facteurs de transcription recrutés par Tax. Ceci va conduire à la diminution de l'expression de Tax et favoriser ainsi l'échappement au SI que nous avons évoqué précédemment. Contrairement à Tax, dont l'expression n'est pas ou peu détectée dans les ATL, HBZ est constitutivement exprimée dans les cellules infectées et les ATL, suggérant que HBZ pourrait jouer un rôle dans le maintien du phénotype tumoral. De plus il a été

montré que l'ARNm de HBZ pouvait promouvoir la prolifération des cellules T (Satou et al., 2006). En outre, il a été démontré que seule la forme épissée de l'ARNm de HBZ (par opposition à la forme non épissée) pouvait induire la prolifération des cellules ATL (Yoshida et al., 2008). Ces observations combinées appuient fortement l'idée que HBZ joue un rôle important dans l'oncogenèse associée à HTLV-1. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour déterminer pleinement le rôle de cette protéine dans le développement de l'ATL. Le fait que l'on trouve une expression de AID et de Twist-1 dans des cellules ATL qui n'expriment plus Tax, nous laisse penser que la protéine HBZ pourrait maintenir l'expression de ces protéines via les voies NF- κ B et AP-1. A ce jour aucune étude n'a démontré l'implication de HBZ dans l'expression de ces protéines. L'analyse des transcrits de AID et Twist-1 en qPCR sur des cellules HeLa transfectées avec un plasmide permettant l'expression de HBZ, n'a révélé aucune induction de l'expression de ces deux gènes. Cependant comme nous l'avons évoqué, les lignées cellulaires ne sont pas le modèle le plus adapté, du fait qu'elles dérivent le plus souvent de cellules cancéreuses dans lesquelles de nombreux gènes sont soit inactivés soit up-régulés. La question de la capacité de HBZ à induire l'expression de AID et Twist-1 reste donc entière. La transduction d'un vecteur lentiviral, permettant l'expression de HBZ, dans des LT CD4+ primaires pourrait nous éclairer sur la capacité de HBZ à induire l'expression de AID et/ou Twist-1.

Il y a une autre possibilité qui n'est jamais évoquée dans le maintien de l'expression des gènes cellulaire et du phénotype tumoral. Le développement de l'ATL est un processus long, de plusieurs dizaines d'années et aujourd'hui les mécanismes précis du développement de la pathologie reste inconnu. Nous ne savons pas si l'ATL survient spontanément après une longue période asymptomatique ou bien s'il résulte de la longue et lente accumulation de mutations au sein des cellules. Nous ne savons pas non plus à quel moment de la transformation cellulaire la protéine Tax cesse d'être exprimée. Nous pouvons donc penser que si la perte de Tax se produit dans des phases relativement tardives de la transformation, la cellule ayant acquis suffisamment de modifications génétiques et épigénétiques n'a plus besoin de protéines virales pour maintenir son phénotype tumoral. Comme nous le discutons plus bas, l'effet de HBZ sur les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 reste plutôt controversé, nous pouvons ainsi envisager que le maintien de l'expression de AID et Twist-1 ne dépend pas de HBZ.

2. Implication de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées et la chimiorésistance.

Au cours de ce projet nous avons pu confirmer les résultats de de la Fuente et al., et démontré que Tax active le promoteur de *bfl-1* via NF- κ B et AP-1. Nous avons également pu démontrer que l'infection *in vitro* de cellules T primaires et *in vivo* de souris BRG et NSG par HTLV-1 entraîne l'expression de Bfl-1 dans les LT CD4⁺ ((Villaudy et al., 2011) ; Riquet et al., en préparation). Ces deux derniers modèles semblent confirmer de manière certaine que Bfl-1 est surexprimée suite à l'infection par HTLV-1.

2.1. HBZ module l'expression de Bfl-1 induite par Tax

De plus en plus d'études se concentrent sur la protéine virale anti-sens HBZ qui est la seule protéine virale exprimée dans toutes les cellules ATL. En effet si le rôle de Tax dans l'initiation de la leucémogénèse est bien admis, celui de HBZ dans le maintien du phénotype tumoral n'a été que suggéré. Des études ont montré que HBZ module l'expression de gènes via c-Jun et JunD (Basbous et al., 2003; Edelstein et al., 2003; de la Fuente et al., 2003; Gaudray et al., 2002; Thébault et al., 2004), nous poussant à étudier la régulation de *bfl-1* par HBZ en ciblant la voie AP-1. Nous avons trouvé que la protéine HBZ seule est incapable d'induire l'activation du promoteur de *bfl-1* à la fois dans des cellules HeLa et des cellules Jurkat. Nous avons montré que HBZ co-exprimée avec c-Jun inhibait son activité au niveau du promoteur de *bfl-1*. Nous avons également observé la diminution de l'expression de c-Jun de manière inversement proportionnelle à la quantité de HBZ exprimée. Ces données sont consistantes avec d'autres études montrant que HBZ inhibait l'activité de c-Jun et induisait sa dégradation par le protéasome (Basbous et al., 2003; Thébault et al., 2004). A l'inverse nous avons démontré que HBZ pouvait coopérer avec JunD pour activer le promoteur de *bfl-1*. HBZ peut donc exercer deux effets bien distincts sur un même gène en fonction de son partenaire cellulaire mais la relevance fonctionnelle reste à élucider. En effet quel pourrait être l'effet de HBZ sur l'activation du promoteur de *bfl-1* dans un contexte physiopathologique ou la voie classique de NF-

kB, c-Jun, JunD et JunB sont exprimés ? Il semble que JunD soit le seul membre de la famille Jun exprimé dans les cellules ATL (Matsuoka, 2010; Nakayama et al., 2008). Nous pouvons donc penser que HBZ va préférentiellement s'associer à JunD et ainsi maintenir l'expression de Bfl-1 dans les cellules où Tax n'est plus exprimée.

La question se pose alors du rôle de HBZ sur l'expression de Bfl-1 dans les cellules infectées ainsi que dans les cellules ATL exprimant à la fois Tax et HBZ. HBZ coopère-t-il avec Tax pour up-réguler l'expression de *bfl-1* ou bien antagonise-t-il l'activation du promoteur de *bfl-1* induite par Tax ?

Pour répondre à cette question nous avons étudié l'impact de l'expression simultanée de Tax et HBZ sur l'expression de *bfl-1* en variant le rapport Tax/HBZ ce qui nous a permis de mimer ce qui se passe dans les cellules infectées ou le niveau d'expression de Tax décroît jusqu'à devenir nul dans 60% des cellules ATL (données non montrées). Nous avons montré que HBZ module la coopération entre Tax et les membres AP-1 sur le promoteur de *bfl-1*. Plus particulièrement nous avons observé que HBZ inhibe l'activation de *bfl-1* par Tax/c-Jun alors qu'il potentialise la coopération de Tax et JunD. Ces résultats montrent encore une fois un rôle contradictoire de HBZ sur l'expression de *bfl-1*. Il est à noter que le niveau d'activation du promoteur de *bfl-1* décroît de manière proportionnelle au niveau d'expression de Tax. Ces données suggèrent que la protéine virale Tax est majoritairement impliquée dans l'induction de l'expression de *bfl-1*.

Mais alors que se passe-t-il dans les cellules infectées par HTLV-1 ? Nos résultats couplés à ceux de la littérature ne nous permettent que de formuler l'hypothèse suivante. Dans les phases précoces du développement de l'ATL, la protéine Tax est très fortement exprimée et va induire l'expression de *bfl-1*. Le ratio d'expression entre Tax et HBZ étant très largement en faveur de Tax, la régulation de l'expression de *bfl-1* par Tax peut s'affranchir des effets de HBZ. Nous avons confirmé cette hypothèse lorsque nous avons éteint l'expression de Tax dans les lignées cellulaires Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ. L'extinction de Tax mais pas celle de HBZ conduit à la perte d'expression de Bfl-1. On peut donc penser que de part son potentiel prolifératif et anti-apoptotique Bfl-1 participerait à la prolifération et à la survie des cellules infectées par HTLV-1.

Dans les phases tardives de l'ATL, où Tax n'est plus ou peu exprimée, HBZ reste exprimée de manière constitutive. Or nous avons vu que le rôle de HBZ sur l'activation du promoteur de *bfl-1* est controversé. Nous pouvons donc formuler trois hypothèses quant à l'expression de Bfl - 1 dans les ATL.

La première hypothèse est que Bfl-1 n'est exprimée que dans les ATL exprimant Tax, favorisant ainsi la survie de ces cellules. Il faut quand même noter que le ratio de 40% de patients dont les cellules ATL expriment encore Tax est sujet à controverse puisque certaines études démontrent que la plupart des cellules ATL expriment Tax au niveau transcriptomique (Usui et al., 2008 ; Ishikawa et al., 2010). Si ces données s'avèrent exact le rôle de Bfl-1 pourrait s'avérer crucial dans la survie des cellules ATL.

La deuxième hypothèse est que l'expression de Bfl-1 dans les ATL est indépendante de Tax et HBZ. Dans un tel contexte, le maintien de l'expression de Bfl-1 pourrait être dû à l'expression et l'activation constitutive de la voie classique NF- κ B dans les ATL.

Dans la troisième hypothèse, on suppose que Bfl-1 n'est plus exprimée dans les ATL. La survie des cellules ATL serait alors totalement indépendante de Bfl-1.

Afin d'apporter un début de réponse à cette question nous avons analysé l'expression de la protéine Bfl-1 dans des PBMC de donneurs sains, des PBMC de deux patients présentant un ATL aigu et deux patients atteints d'ATL chronique. Nous avons retrouvé une expression de la protéine de Bfl-1 dans les deux ATL aigus mais pas dans les ATL chroniques ou les PBMC de donneurs sains. Malheureusement ce ratio de 50% sur un échantillonnage aussi réduit ne nous permet pas d'apporter de réponses. De plus à la vue de la très faible quantité de matériel que nous avons pu extraire de ces échantillons, nous avons été dans l'incapacité de tester l'expression de Tax et HBZ. Il nous est donc impossible de savoir si l'expression de Bfl-1 est restreinte à celle de Tax dans les ATL. L'étude d'une cohorte de patients ATL nous permettrait de statuer sur l'expression de Bfl-1 dans les ATL et d'envisager un potentiel rôle dans la survie de ces cellules ainsi que dans la chimiorésistance qui les caractérisent.

Concernant le rôle de HBZ dans la régulation de l'expression de Bfl-1 nous devons prendre en considération qu'à ce jour, 3 isoformes de HBZ ont été décrites, la forme

non splicée (usHBZ), et 2 formes splicées (s1HBZ et s2HBZ). Dans un contexte viral aucune fonction n'a encore été associée à s2HBZ et la demi-vie de s1HBZ est plus longue que celle de usHBZ, suggérant un rôle important de s1HBZ. Cependant aucune donnée ne nous permet d'affirmer que la forme s1HBZ est la forme exprimée par le plasmide utilisé. En effet lors de la construction de ce vecteur, toutes les isoformes n'avaient pas encore été décrites. Le fait que nous ne sachions pas si toutes les isoformes, ni même quelles isoformes sont exprimées induit un biais qui ne reflète peut être pas la réalité physiopathologique de l'infection par HTLV-1. Un séquençage de ce vecteur ainsi qu'une analyse des transcrits de HBZ exprimés nous éclaireraient sur la relevance de ce travail.

2.2. Bfl-1 promeut la survie des cellules infectées par HTLV-1

L'intérêt de cette partie des travaux est d'identifier le rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées par HTLV-1. Une étude intéressante de Zane et al., a démontré que les LT CD8⁺ mais pas les CD4⁺ étaient résistant à la mort induite par Fas. Ces données laissent donc la porte ouverte à l'implication de la voie intrinsèque et notamment de Bfl-1 dans la survie des LT CD4⁺ infectés. Nos travaux ont montré que l'extinction de Tax à l'aide de shRNA dans les Jurkat exprimant stablement Tax et HBZ (cellules E12) conduit à la perte d'expression de Bfl-1 et sensibilise ces cellules à l'apoptose. A l'inverse l'extinction de l'expression de HBZ dans ces mêmes cellules n'affecte pas leur survie, suggérant que Tax seul est impliqué dans la survie des cellules. La corrélation entre perte d'expression de Tax et Bfl-1 et accroissement de la mort spontanée des cellules nous a conforté dans l'idée que Bfl-1 peut jouer un rôle important dans la survie des cellules HTLV-1⁺.

Nous avons confirmé cette hypothèse en utilisant des shRNA anti-bfl-1 ainsi que anti-bcl-2 en contrôle dans les Jurkat et dans les lignées cellulaire T HTLV-1⁺ C91PL et MT-4. Nous avons observé que l'extinction de l'expression de bfl-1 conduisait à une mortalité d'environ 40% dans les C91PL et 80% dans les MT-4 alors que l'inhibition de l'expression de Bcl-2 n'affecte pas la mortalité des cellules. Ces résultats indiquent de manière claire que Bfl-1 est impliqué dans la survie des cellules infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax. Nous pouvons ainsi penser qu'en protégeant les cellules

infectées de l'apoptose, Bfl-1 peut favoriser la persistance de dommages à l'ADN, comme ceux induit par AID et l'apparition de cellules pré-tumorales

Néanmoins ces observations sont basées sur la mort spontanée de lignées cellulaires, il est donc normal qu'elle n'atteigne pas 100% et il est difficile d'évaluer le rôle de Bfl-1 dans la survie dans ces conditions. Il serait intéressant de mesurer l'apoptose des cellules primaires infectées par HTLV-1 exprimant ou non Bfl-1 suite à l'induction *in vitro* de l'apoptose. Une autre perspective serait de réaliser une extinction inductible de l'expression de Bfl-1 dans les LT CD4⁺ de souris NSG suite à l'infection par HTLV-1. Selon le même principe que proposé pour AID, il faudrait transduire les progéniteurs CD34⁺ avec des vecteurs lentiviraux permettant une expression inductible de shRNA anti-bfl-1. Ces travaux nous donneraient une idée bien plus précise sur l'implication de Bfl-1 dans la survie des LT CD4⁺ infectés et la progression de la pathologie.

2.3. Bfl-1 pourrait être impliquée dans la chimiorésistance des formes agressives d'ATL

Bfl-1 est surexprimée dans un grand nombre de tumeurs solides comme le cancer de l'estomac ou des poumons ainsi que dans bon nombre de leucémies et de lymphomes B. Son expression est souvent associée à un mauvais pronostic et à une résistance des cellules vis à vis de l'apoptose induite par l'étoposide (Wang et al., 1999), la staurosporine (Shim et al., 2000)(Shim et al., 2000) ou encore le cisplatine (Cheng et al., 2000). De plus une étude menée au sein de l'équipe par Gaëlle Brien a permis de mettre en évidence que l'extinction de l'expression de Bfl-1 sensibilise des lignées cellulaires B tumorales à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine, la vincristine, le cisplatine ou la fludarabine ou encore la mort induite par le rituximab (anti-CD20 ; Brien et al., 2007). Ces différentes études démontrent le rôle de Bfl-1 dans la chimiorésistance des cellules B malignes.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction les cellules ATL sont également caractérisées par une chimiorésistance face aux agents thérapeutiques conventionnels. Bfl-1 pourrait donc être au moins en partie responsable de la chimiorésistance de ces cellules. Nous avons donc testé l'implication de Bfl-1 dans la chimiorésistance. L'utilisation de Bay11-7082, un inhibiteur de NF-κB utilisé dans le

traitement de l'ATL, inhibe l'expression de Bfl-1 et induit l'apoptose de lignées cellulaires T HTLV-1⁺. De plus le traitement à la doxorubicine, également utilisé dans le traitement de l'ATL, induit la mort des cellules dont l'expression de Bfl-1 a été préalablement réprimée par shRNA alors que les cellules exprimant Bfl-1 restent insensibles. Ces données mettent en évidence pour la première fois le rôle de Bfl-1 dans la chimiorésistance des cellules HTLV-1⁺. De plus comme nous l'avons discuté plus haut, l'expression de Bfl-1 a été retrouvée dans les deux ATL aigus étudiés mais pas dans les formes chroniques qui sont des sous-types indolents ou dans les PBMC de donneurs sains. Les formes aiguës d'ATL sont les plus agressives décrites et ne répondent à aucun traitement. Bien que l'échantillonnage soit trop faible pour être significatif, ces résultats vont dans le sens de notre hypothèse et des autres résultats de la littérature. On peut donc envisager que Bfl-1 soit impliqué dans la chimiorésistance des cellules ATL et pourrait être un facteur de mauvais pronostic permettant de discriminer les formes aiguës des formes indolentes. Afin de valider cette hypothèse il est indispensable de mener une étude sur une plus grande cohorte de patients regroupant les 4 formes d'ATL. Si cette hypothèse venait à se confirmer et que l'expression de Bfl-1 était un marqueur des formes agressives d'ATL, Bfl-1 deviendrait alors une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

A ce jour plusieurs petites molécules ciblant les membres de la famille Bcl-2 ont été développées et font l'objet d'essais cliniques. Parmi celles-ci l'ABT-737, développée par les laboratoires ABBOTT, cible spécifiquement Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w mais pas Mcl-1 ni Bfl-1. Une limitation à l'efficacité de cette molécule est l'expression par les cellules tumorales des protéines Bfl-1 et Mcl-1 (Alharbi S et al Blood 2011 ; Yecies D Blood 2010 ; Vogler M CDD 2012), illustrant la nécessité de développer des molécules ciblant spécifiquement Bfl-1 et/ou Mcl-1.

Suite à l'identification d'aptamères ciblant Bfl-1 et sensibilisant des lignées cellulaires dérivant de lymphome B à des agents chimiothérapeutiques (Brien *et al.*, 2011), des travaux menés dans le groupe de Nathalie Bonnefoy ont conduit à l'identification de deux petites molécules spécifiques Bfl-1 (Mathieu et al., 2014). Ces deux composés en inhibant l'interaction entre Bfl-1 et ses partenaires pro-apoptotiques, Bim, Bax et

Bak, affectent sensiblement la survie de cellules B malignes exprimant fortement Bfl-1 et sensibilisent ces cellules à l'apoptose induite par le composé ABT-737.

Il serait intéressant ensuite de tester l'efficacité de ces molécules sur les tumeurs de souris NSG infectées par HTLV-1 et de voir si elles sont capables de réduire la taille des tumeurs de manière spontanée. Une deuxième étape serait de voir si le traitement combiné de ces petites molécules et d'agents chimiothérapeutiques, utilisés dans le traitement de l'ATL, permettrait la résorption des tumeurs et la rémission des souris. Si ces tests s'avéraient concluant, le développement de médicaments basés sur ces petites molécules utilisés en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques pourrait fournir une bien meilleure stratégie dans le traitement de formes agressives de l'ATL.

3. Modèle présentant le rôle de AID et BFL-1 dans l'instabilité génomique et la survie induite par Tax au cours du développement de l'ATL.

Le processus de développement de l'ATL est long et complexe. Comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, l'oncoprotéine Tax joue un rôle crucial dans l'initiation de la tumorigenèse associée à l'infection par HTLV-1. Nos résultats ont démontré que Tax induisait l'expression des protéines AID et Bfl-1 capables respectivement d'éditer le génome et d'induire la survie des cellules. Les travaux que nous avons menés ont permis de mettre en évidence un rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées et la chimiorésistance des lignées infectées par HTLV-1. Concernant AID nous avons pu démontrer que la protéine AID est fonctionnelle et induit des dommages à l'ADN *in vitro* et *ex vivo*. Cependant le rôle physiologique de ces deux protéines n'a pas été identifié.

Nous pouvons néanmoins émettre des hypothèses quant aux rôles joués par AID et Bfl-1 lors du développement de l'ATL.

- dans les phases précoces, Tax est fortement exprimé et va induire l'expression de AID et Bfl-1 via les voies NF- κ B et AP-1. AID peut alors éditer le génome de la cellule infectée tandis que Bfl-1 favorise la survie des cellules en bloquant l'apoptose. Cependant, à ce stade l'expression élevée de Tax qui est fortement immunogène et qui va induire un stress intense au sein de la cellule, va conduire à l'élimination des cellules par le système immunitaire. De plus nos résultats préliminaires suggèrent qu'une forte expression de AID entraîne l'expression des ligands de NKG2D, permettant la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par les cellules NK.
- L'expression de Tax est ensuite progressivement inhibée d'une part par les protéines HBZ et p30 et d'autre part par des mutations au niveau du gène de Tax, mutations potentiellement induites par AID. La diminution de l'expression de Tax permet l'échappement des cellules infectées à la surveillance par le système immunitaire. Dans ce contexte on peut penser que AID va éditer le génome de la cellule hôte permettant l'apparition de SSB, DSB et de mutations. Bfl-1 quant à lui va favoriser la survie de ces cellules en inhibant l'apoptose. Les cellules vont ainsi pouvoir accumuler des anomalies génétiques et chromosomiques, favorisant l'émergence de clones malins qui pourront chez certains patients se transformer en clones ATL.

- Dans les phases tardives où les cellules se sont transformées en cellules ATL, et dans lesquelles AID et Bfl-1 semblent toujours exprimés, on peut penser que AID continue d'éditer le génome. Bfl-1 va induire la survie de ces cellules et pourrait être impliquée dans la chimiorésistance des cellules ATL aux drogues conventionnelles. Bfl-1 apparaît ici comme une nouvelle cible thérapeutique permettant de sensibiliser les cellules ATL aux agents chimiothérapeutiques.

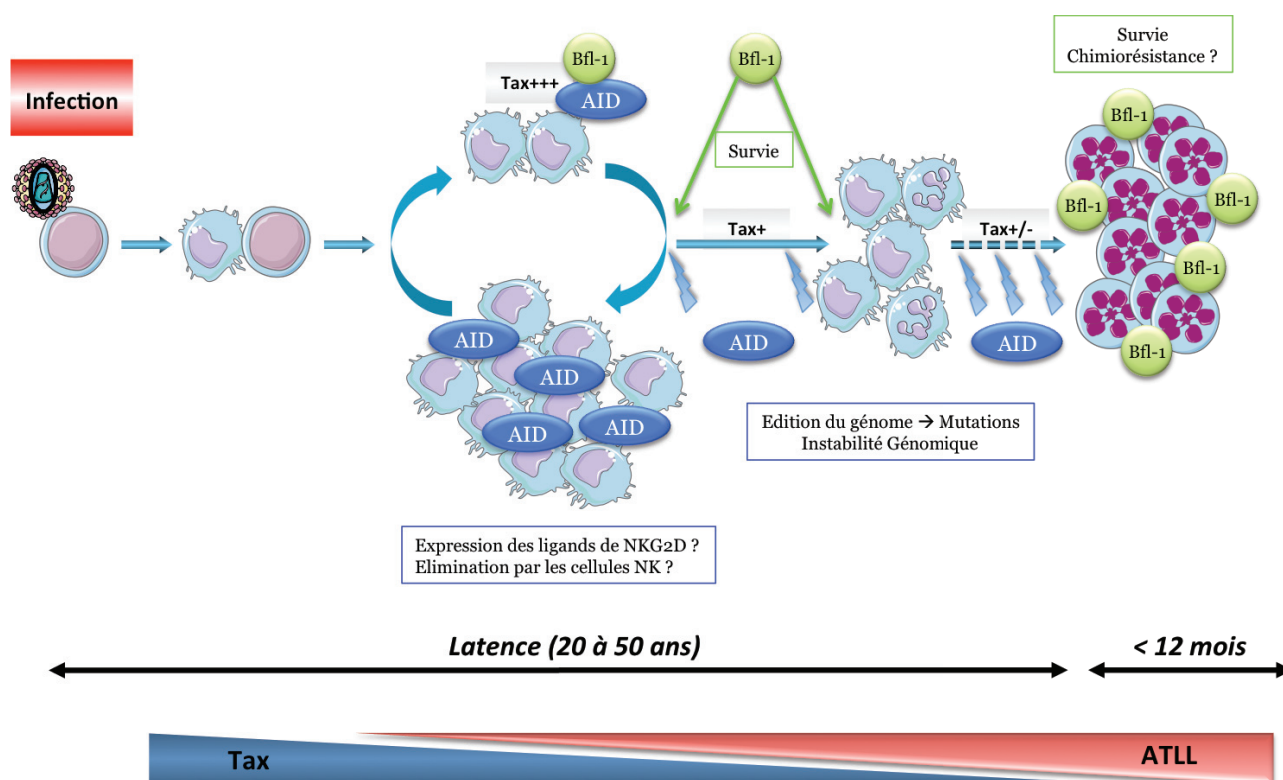


Figure 26 : Modèle présentant le rôle de AID et BFL-1 dans l'instabilité génomique et la survie induite par Tax au cours du développement de l'ATL. La protéine virale Tax est fortement exprimée (Tax +++) suite à l'infection par HTLV-1 et au cours des étapes précoces du développement de l'ATLL. Tax va induire l'expression de AID et de Bfl-1 via les voies NF- κ B et AP-1. La surexpression de AID pourrait participer à l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire en induisant l'expression des ligands de NKG2D. L'expression de Tax va par la suite diminuer (Tax +) sous l'action d'autres protéines virales comme HBZ ainsi que suite à l'apparition de mutation sur la séquence de Tax potentiellement induites par Tax. Bfl-1 va favoriser la survie des cellules infectées en inhibant l'apoptose. Les cellules vont ainsi accumuler des anomalies génomiques tout en continuant de proliférer. Dans les phases tardives (Tax +/-), l'expression combinée de AID et de BFL-1 peut favoriser l'émergence de cellules pré-cancéreuses qui pourront progresser en clones ATL. L'expression de Bfl-1 dans ces cellules induirait leur survie et pourrait participer à la chimiorésistance des cellules ATL.

Annexes

4. Article 3 : The emerging role of Twist1 and Twist2 in lymphocytes and haematological malignancies.

The emerging role of Twist1 and Twist2 in lymphocytes and haematological malignancies.

Merindol N, Riquet A, Szablewsky V, Eliaou J-F, Puisieux A, Bonnefoy N.



REVIEW

The emerging role of Twist proteins in hematopoietic cells and hematological malignancies

N Merindol¹, A Riquet¹, V Szablewski^{2,3}, J-F Eliaou^{2,4}, A Puisieux⁵ and N Bonnefoy²

Twist1 and Twist2 (Twist1–2) are two transcription factors, members of the basic helix-loop-helix family, that have been well established as master transcriptional regulators of embryogenesis and developmental programs of mesenchymal cell lineages. Their role in oncogenesis in epithelium-derived cancer and in epithelial-to-mesenchymal transition has also been thoroughly characterized. Recently, emerging evidence also suggests a key role for Twist1–2 in the function and development of hematopoietic cells, as well as in survival and development of numerous hematological malignancies. In this review, we summarize the latest data that depict the role of Twist1–2 in monocytes, T cells and B lymphocyte activation, and in associated hematological malignancies.

Blood Cancer Journal (2014) 4, e206; doi:10.1038/bcj.2014.22; published online 25 April 2014

INTRODUCTION

Twist1–2 main functions

Twist1 and Twist2 (Twist1–2) are two distinct tissue-restricted transcription factor members of the basic helix-loop-helix (bHLH) class B family that display high sequence similarity with each other. They play a critical role in embryogenesis, particularly in the inhibition of mesenchymal cell development. In humans, mutations in *twist1* cause the Saethre–Chotzen syndrome, an autosomal dominant inheritance disease principally characterized by craniosynostosis (premature closure of claval suture).^{1,2} Heterozygous *twist1*^{+/-} mice show craniofacial and limb abnormalities, whereas *twist1*^{ko} mice die early during embryogenesis. Twist2 is expressed after Twist1 in mesodermal tissues during embryogenesis. Twist2 inhibits terminal differentiation of mesoderm-derived cells, such as myocytes, osteoblasts and adipocytes.^{3–6} In humans, mutations in *twist2* are associated with the Setleis Syndrome, an inherited developmental disorder characterized by bilateral temporal marks and other facial features.⁷ *Twist2*^{ko} mice exhibit normal embryogenesis but die 2–3 days after birth of generalized cachexia caused by high levels of proinflammatory cytokines.⁸

A complex regulation

The expression of Twist1–2 is triggered by diverse signaling pathways linked to inflammatory-related cytokines via nuclear factor (NF)-κB⁹ and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3),¹⁰ and to stress conditions via WNT/β-catenin¹¹ and hypoxia-inducible factor-1.^{12,13} As described throughout this review, their expression is tightly regulated, context dependent and multifactorial.

To confuse the situation, once expressed, Twist1–2 may function either as transcriptional activators or repressors, through both direct and indirect mechanisms.^{14–16} They act through direct mechanisms when they bind to conserved DNA E-box sequences

(5'-NCANNTGN-3') present in the regulatory region of many lineage-specific genes¹⁷ and function as transcription factors (Figure 1); through indirect mechanisms when they activate/repress gene expression via recruitment of co-activators/repressors at the E-boxes they are bound to, or when they associate with other transcription factors such as MEF2, RUNX1, RUNX2, CEBP-α and NF-κB to modulate gene transcription^{5,8,18,19} (Figure 1).

Mechanisms that influence transcription regulation by Twist1–2 include (1) their spatial and temporal regulation, (2) their post-translational modifications (acetylation and phosphorylation), (3) their dimer choice, (4) their affinity with potential dimers and (5) protein–protein interactions (Figure 1).

The most characterized post-translational modification of Twist1 is its phosphorylation on serine 68 (S68) by mitogen-activated protein kinases such as p38, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase-1/2.^{20,21} S68 phosphorylation inhibits ubiquitylation-mediated degradation of Twist1 and thus regulates its half-life and availability. PKA (protein kinase A), PKC, PKB/Akt and PP2 can all modulate Twist1 phosphorylation levels at several other amino acid positions.^{20,22–24}

Twist1–2 can also influence gene transcription through epigenetic modulation of the promoter region. Indeed, Twist1–2 were reported to interact with and recruit histone acetyl transferases/histone deacetylases to the promoter regulatory region that results in transcription repression through histone modification^{4,14,15} (Figure 1).

Twist1–2 may form homodimers and heterodimers with class A bHLH^{5,25} E protein transcription factors or E2A that contain both E12 and E47-Tcf3 and are implicated in immune cell development.²⁶ Twist1–2 partner choice depends mostly on its accessibility and on Twist1–2 phosphorylation acetylation state,^{23,27} and this choice of partner will determine which genes are transcriptionally targeted (Figure 1). Availability of E proteins is not only determined by their expression but also by the presence

¹Université de Lyon and INSERM U1111, Lyon, France; ²IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, Université Montpellier 1, Montpellier, France;

³Département de Biopathologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université Montpellier 1, Montpellier, France; ⁴Département d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université Montpellier 1, Montpellier, France and ⁵Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM UMR-51052, Centre Léon Bérard, Lyon, France. Correspondence: Dr N Merindol, 380 rue Pie XII, Trois-Rivières, QC G8W1S8, Canada.

or Dr N Bonnefoy, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, 208 rue des Apothicaires, Montpellier, F-34298, France.

E-mail: natashamerindol@yahoo.ca or nathalie.bonnefoy@inserm.fr

Received 25 February 2014; accepted 17 March 2014

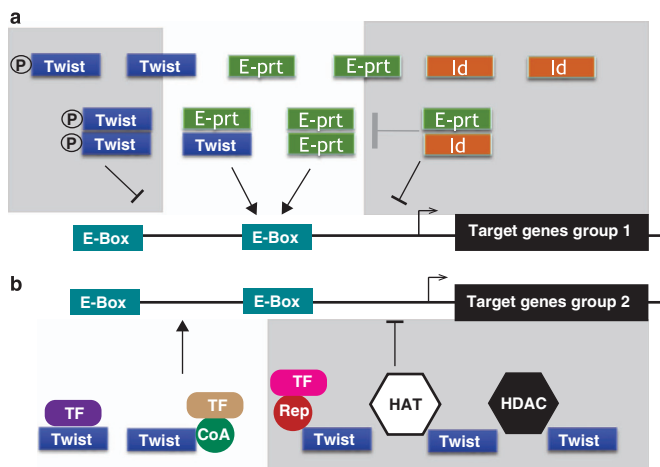


Figure 1. Transcriptional regulation by Twist proteins. (a) The bHLH partner competition. Twist1–2 might act directly as transcription factors through binding to E-boxes (5'-NCANNTGN-3') in the promoter regulatory region of multiple lineage-specific genes. They may form homodimers and heterodimers with class A bHLH transcription factor E proteins (E12 and E47). Twist1–2 partner choice depends mostly on their accessibility and on Twist1–2 phosphorylation status. Availability of E proteins is determined by their level of expression and by the presence of Id (inhibition of DNA binding) proteins (Id1, Id2, Id3 and Id4) that lack a DNA-binding domain. The relative stoichiometry of each participant will define partner choice that, in turn, will determine the scheme of gene targeting. E-prt, E proteins; Twist; Twist1 or Twist2. (b) Pathways of transcriptional regulation. Twist1–2 might also activate gene expression through direct interaction with transcription factors (such as MEF2, RUNX1, RUNX2, CEBP- α and NF- κ B) and co-activators of transcription factors. They can inhibit transcription through direct interaction and sequestration of transcription factors, their repressors or through epigenetic modulation by recruitment of histone acetyltransferase and histone deacetylase at the promoter region. CoA, co-activator; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; Rep, repressor; TF, transcription factors.

of a third class of bHLH proteins that lack the DNA-binding domain: namely Id (inhibition of DNA binding) proteins (Id1, Id2, Id3 and Id4). They display great affinity for E2A proteins, in particular for E12, and therefore limit its availability, alter the possible dimerization pools, prevent its DNA binding and compete against Twist1–2^{27,28} (Figure 1). The formation of Twist1/E47 heterodimers seems to stabilize Twist1, whereas detection of Twist1/Id1 heterodimers has been associated with destabilization and degradation of Twist1.²⁹ Twist1–2 also modulate the expression of E protein-dependent genes by sequestering E-protein modulators. Ultimately, the relative stoichiometry of each E protein, Id repressors and Twist1–2 will determine the expression profile and cell fate, that is, homodimers of Twist will be preferentially found when Id proteins sequester E12 (Figure 1). Finally, in 2010, Danciu and Whitman³⁰ proposed that the redox state of the cell is also involved in transcriptional outcome by stabilizing disulphide bonds between Twist1–2 homodimers and thus preventing heterodimer formation.

A major role for Twist1–2 in regulating inflammation

The perinatal death due to high levels of proinflammatory cytokines of mice with a *twist2*^{KO} genotype or carrying *twist1* and *twist2* haploinsufficiency hints at a key role for Twist1–2 in the control of proinflammatory response, and illustrates the complexity of the transcriptional regulation mechanisms by and of Twist1–2. On one hand, they both regulate proinflammatory cytokine expression by interfering with NF- κ B-dependent gene transcription. They interact physically with NF- κ B (as demonstrated for Twist1 in COS cells), and bind to E-boxes in the regulatory regions of NF- κ B-regulated cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF α) and interleukin (IL)-1 β , as shown in

murine macrophages⁸ (Figure 1). Furthermore, Twist2 is able to inhibit IL12 and interferon- γ (IFN γ) expression and to activate the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10,³¹ whereas upon phosphorylation on S42 by PKB/Akt, Twist1 is able to enhance anti-inflammatory TGF β receptor signaling.²¹

On the other hand, Twist1–2 expression itself is activated by NF- κ B, suggesting the existence of a negative feedback loop where NF- κ B pro- and anti-apoptotic pathways are activated by cytokines (such as TNF α), leading to downstream activation of other cytokines and of Twist1–2. In turn, Twist1–2 interact with p65/RelA subunit of NF- κ B, causing the repression of NF- κ B-mediated transactivation of cytokines.⁸ Their activation and interaction by and with NF- κ B is conserved across species. This negative feedback loop sets Twist1–2 as central modulators of the NF- κ B proinflammatory pathway.

Finally, their role in the proinflammatory response incidentally implicates Twist1–2 in the modulation of the immune system response. Indeed, recent studies show their considerable role in immune cell function. Moreover, dysregulation of Twist1 or Twist2 are implicated in the pathogenesis of various hematological malignancies.^{31–33}

FUNCTIONS OF TWIST1–2 IN HEMATOPOIETIC LINEAGES

Myeloid lineage

In the hematopoietic system, the expression of Twist1 is largely observed in CD34⁺ hematopoietic stem cells,^{34–36} whereas Twist2 is mostly expressed in the myeloid lineage.³¹ Twist2 is a major negative modulator of both the development of myeloid cells and their proinflammatory responses. It is expressed in granulocyte-macrophage progenitors, and inhibits their proliferation and differentiation into macrophages, neutrophils and basophils,

through direct interaction and inhibition of RUNX1 and C/EBP α transcription factors.³¹ In mature myeloid cells, Twist2 negatively regulates the proinflammatory responses by inhibiting the expression of proinflammatory cytokines such as IL12, IFN γ , IL1, TNF α , IL6, monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α through inactivation of C/EBP α and NF- κ B, while activating anti-inflammatory IL10 expression³¹; (Table 1).

In murine mature macrophages, Twist1–2 are also implicated in an anti-inflammatory feedback loop triggered by IFN α to counteract production of TNF α .³³ Indeed, IFN type I strongly induced (1) mRNA and protein expression of Twist1–2 through induction of the receptor tyrosine kinase Axl, (2) responsiveness to Axl ligands and (3) concomitant reduction of TNF α expression. Sharif *et al.*³³ showed evidence that suppression of TNF α expression was mediated in part by Twist1–2 binding to E-boxes in the TNF α promoter region. Twist1–2 also modulate the function of several other transcription factors expressed in macrophages such as E-proteins, myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP1), positioning them as central in the regulation of macrophage priming and anti-inflammatory response.^{4,5,18,37}

Although its precise role is still unknown, Twist1 is also expressed in follicular dendritic cells that are specialized mesenchymal-derived stromal cells found in the germinal centers of lymphoid tissues that trap and present immune complexes to B cells, enabling their maturation.³⁷

Lymphoid lineage

T lymphocytes. The T lymphocyte family encompasses CD8⁺ T lymphocytes that are cytolytic effector cells, CD4⁺ helper T cells whose role is auxiliary to other immune cells, and CD4⁺ regulatory T cells. T cells are further differentiated into naive, effector memory (EM), central memory (CM) and terminally

differentiated effector memory phenotypes depending on their exposure to and activation by their antigen (reviewed in Appay *et al.*³⁸). CD4⁺ helper T lymphocytes are also divided in different subsets that display different functions. The best characterized includes T helper 1 (T_H1) and T helper 2 (T_H2), and other subsets such as T helper 17 (T_H17), follicular helper T cells (T_H) and the more recently described T helper 9 (T_H9) (reviewed in Wan *et al.*³⁹).

There are ever-increasing data aiming to decipher the role of Twist1–2 in the T-cell response. These studies seem to suggest that, in this context, Twist1–2 display different and nonredundant functions.

Twist1 and T lymphocytes. In 2008, Niesner *et al.*⁴⁰ were the first to identify Twist1 as a key modulator of T_H1 lymphocyte proinflammatory response in mice. They observed that Twist1 expression was predominant in differentiated T_H1 effector memory cells. Accordingly, Twist1 expression was transiently induced following T cell receptor stimulation through NFAT (nuclear factor of activated T cells) and NF- κ B, then enhanced and constantly detected upon repeated T cell receptor stimulations. Its expression was also activated by IL12 via STAT4. Following activation of naive T_H1 cells, NFAT, NF- κ B and STAT4 had to be bound to their respective binding sites in the promoter region of *twist1* to induce its transcription, whereas in activated T_H1 cells, NFAT and NF- κ B binding to the *twist1* promoter region was sufficient to trigger its expression. *Ex vivo*, Twist1 expression was mostly observed in memory CD4⁺ T cells and was especially high in chronically activated CD4⁺ T cells. Furthermore, the authors described that ectopic overexpression of Twist1 in 6-day-old T_H1 cells drastically reduced their pathogenic contribution in inflammation, whereas Twist1 silencing enhanced their potential to induce chronic inflammation. These results imply a key role for Twist1 in limiting inflammation in T_H1 cells. In T cells, as in macrophages, Twist1-mediated repression of NF- κ B-activated pathways seems to act through binding to E-boxes in regulatory regions of NF- κ B target genes. In particular, Twist1

Table 1. Functions of Twist1 and Twist2 in hematopoietic cells

	<i>Twist1</i>	<i>Twist2</i>
Myeloid lineage:	- Key regulators of priming and of the anti-inflammatory response of macrophages - Mediators of an anti-inflammatory feedback loop triggered in response to IFNα through Axl to counteract TNFα production.³³ - Modulation of E-proteins, MEF2 and SREBP1^{4,5,19,37} - Expressed in follicular dendritic cells (unknown function).³⁷	- Expressed in myeloid progenitors. - Inhibition of proliferation and differentiation into macrophages, neutrophils, basophils through inhibition of RUNX1 and C/EBPα.³¹ - Expressed in mature myeloid cells. - Negative regulation of the proinflammatory response: activation of IL-10, inhibition of IL12, IFNγ, IL1, TNFα, IL6, MCP1 and MIP1α through inactivation of C/EBPα and NF-κB.³¹
T lymphocytes	- Expressed mainly in T_H1 lymphocytes - Induction by TCR stimulation through NFAT and NF-κB, by IL12 via STAT4⁴⁰ - Prevention of chronic inflammation^{40,42,43} - Inhibition of the proinflammatory response.⁴⁰ - Repression of NF-κB activated pathways, TNFα, IL2, SOCS1, SOCS2, IL1R decoy and Jak2.⁴⁰ - Inhibition of IFN-γ through modulation of T-bet, STAT4 and RUNX3.⁴¹ - Inhibition of T_H17 polarization and T follicular helper development⁴³ - Induced by STAT3 to control IL6 signaling	- Expressed in thymocytes and mature T lymphocytes - Prevention of galectin-1 mediated apoptosis after NF-κB activation during negative selection.^{19,32}
B lymphocytes	NA	Expressed in B cells (unknown function). ⁴⁵

Abbreviations: C/EBP1, CCAAT/enhancer binding protein; IFN, interferon; IL, interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; MEF2, myocyte enhancer factor 2; MIP, macrophage inflammatory protein; NA, not available; NF- κ B, nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells; NFAT, nuclear factor of activated T cells; RUNX1, runt-related transcription factor-1; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein-1; TCR, T cell receptor; T_H, T helper; TNF, tumor necrosis factor.



appeared to dampen inflammation triggered by T_H1 memory cells in mice experiencing delayed-type hypersensitivity and antigen-induced arthritis through the specific targeting of TNF α , IL2, IFN γ , SOCS1, SOCS2, IL1R decoy and Jak2. Interestingly, and in contrast to the well-known properties of Twist1 in the induction of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT),⁴¹ Twist1 expression did not interfere with the homing capacity of T_H1 cells to the inflamed tissue.

The authors further validated their results in humans, showing that expression of Twist1 was low in naive $CD4^+$ T cells, enhanced in activated effector memory $CD4^+$ T cells and even higher in terminally differentiated effector memory $CD4^+$ T cells.⁴⁰ Twist1-expressing $CD4^+$ T cells exhibited the phenotype of activated T_H1 effector memory cells ($CD45RA^-CCR7^-CD27^{+/-}$ and $CCR5^+$). Interestingly, they also show that Twist1 expression was upregulated and persistent in $CD4^+$ T cells recovered from inflamed tissues of patients with chronic inflammation (that is, rheumatic diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis), despite therapeutic treatment. However, they did not definitely validate whether Twist1 was a hallmark of T_H1 rather than of T_H2 or of T_H17 polarization in humans (Table 1).

In summary, Twist1 expression in T cells considerably lowered their contribution to inflammation and tissue destruction in mice. Expression of Twist1 in T_H1 cells acts as an endogenous regulator limiting the proinflammatory potential of T_H1 cells in the continuous presence of antigen with repeated activation of NFAT and NF- κ B. In humans, the specificity of Twist1 upregulation in $CD4^+$ T cells recovered under a chronic inflammation context lead the authors to propose that Twist1 could be used as a biomarker of chronic inflammation.

Pham *et al.*⁴² further defined the role of Twist1 in T_H1 cell-mediated inflammation. They showed that Twist1 modulated inflammation, as measured by inhibition of IFN γ production, by decreasing the expression of T-bet, STAT4 and RUNX3 and their binding to the IFN γ locus. Of note, only RUNX3 overexpression was able to compensate for Twist1-mediated inhibition of IFN γ , and this was achieved through direct physical interaction with Twist1. The authors did not observe direct binding of Twist1 to the promoter regions of IFN γ , TNF α and IL12R β 2. Interestingly, they showed that Twist1 expression was not restricted to T_H1 cells, but could also be measured in T_H2 cells, although at a lower level.

In a subsequent study, the same group identified Twist1 as a key factor that hindered T_H17 polarization.⁴³ They showed that Twist1 was a key component of a STAT3-induced feedback loop that controls IL6 signaling through inhibition of IL6R α to block T_H17 and T_H1 cell development differentiation. Phenotypically, mice with a T cell-specific deletion of Twist1 also exhibited early-onset experimental autoimmune encephalomyelitis, and increased antigen-specific antibody responses, demonstrating a significant role for Twist1 in limiting both cellular and humoral immunity.

Twist2 and T lymphocytes. The function of Twist2 in T lymphocytes and immature thymocytes seems to focus mainly around the prevention of galectin-1-induced apoptosis, a process normally occurring after NF- κ B activation during the negative selection in the thymus. This has been explored in two publications by Koh *et al.*^{19,32} in 2008 and 2009 (Table 1). CD7, a galectin-1 receptor, plays a crucial role in galectin-1-mediated apoptosis of activated T cells. E12 and Twist2 prevent NF- κ B-mediated activation of the CD7 promoter. By doing so, they inhibit galectin-1-induced apoptosis in immature T cells. This targeted inhibition appears to be mediated by direct binding to the E-box in the CD7 promoter or through direct interaction with NF- κ B. In any case, both bHLH transcription factors significantly reduce binding of NF- κ B to the CD7 promoter.^{19,32}

These studies characterize Twist2 as a dangerous inhibitor of negative selection-mediated apoptosis. In this context, it is easily conceivable that Twist2 uncontrolled expression may lead to autoimmunity and/or T-cell oncogenesis.

B lymphocytes. The expression of Twist1–2 in normal B lymphocytes has been poorly described so far. Early evidence of their potential expression came from a study published in 2004 by Raval *et al.*⁴⁴ that focused on of the *twist2* 5' upstream region and its consequence on expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients (see below). DNA methylation occurs in regions rich in CpG islands, typically in the 5' upstream region of genes and results in condensation of the chromatin and downregulation of transcription.⁴⁵ They showed that the *twist2* promoter was not methylated in $CD19^+$ B cells purified from healthy controls and that Twist2 mRNA was indeed detected in these cells. In our hands, Twist1–2 could be detected in B cells in response to several proinflammatory signals (N Merindol, unpublished results). However, further studies are definitely needed to confirm the expression and possible functions of Twist1–2 in B cells.

TWIST1–2 AS EMERGING RISK FACTORS IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

The overexpression of Twist1 has been described as a poor prognostic factor in numerous epithelium-derived malignancies such as breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer, bladder cancer, melanoma, hepatocellular carcinoma and neck carcinoma (reviewed in Puisieux *et al.*⁴⁶). Twist1–2 deregulations have also been more recently detected in hematological malignancies. Their precise roles are ill-defined in this latter context, and probable mechanisms of their oncogenic properties must be extrapolated from results obtained in solid tumors that we briefly summarize below.

The central role of Twist1–2 in embryogenesis and mesodermal development and their targeting of multiple genes coding for cell-fate proteins inevitably links them to cancer and oncogenesis. In brief, Twist1 has been implicated in cancer initiation by counteracting both senescence and apoptosis programs and in cancer progression by increasing resistance to treatment.

In cancer cells where Twist1 or Twist2 expression is increased, it has been demonstrated that they neutralize senescence and cell death through inhibition of both p53 and Rb tumor suppressor pathways⁴⁷ (Figure 2). Interestingly, Twist1–2 E-boxes are found in the regulatory region of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21, P15 (INK4B) and p16 that can induce cell cycle arrest upon DNA damage. Both Twist1–2 repress senescence by inhibiting the transcription of p53 target p21 and of p16.⁴⁷ Furthermore, they inhibit the expression of p14ARF and perturb the p14ARF–MDM2–p53 axis.⁴⁸ In fact, Twist1–2 are able to repress the p53 proapoptotic response at each step that may lead to its activation, through: (1) inhibition of transcriptional co-activators of p53, such as acetyltransferase p300, (2) prevention of p53 phosphorylation and (3) preclusion of p53 DNA-binding activity.^{14,49–51}

Twist1 also offsets the apoptosis response induced by other pathways in addition to the DNA damage response. For example, Twist1 is able to block the c-Myc-induced apoptotic response through modulation of the p14ARF–MDM2–p53 pathway in *in vitro* experiments on mouse embryonic fibroblasts.⁴⁸ N-Myc expression is amplified in neuroblastomas accompanied by a systematic overexpression of Twist1. Prevention of apoptosis by Twist1 in this context could be partly attributable to impaired p14ARF activity, once again through hindering of the p14ARF–MDM2–p53 axis.⁵¹ As a direct consequence of their capacity to override oncogene-induced senescence and apoptosis, Twist1–2 cooperate *in vitro* and *in vivo* with mitogenic oncoproteins for malignant transformation.^{46,49–51} (Figure 2).

In addition, Twist1–2 were recently shown to be involved in the direct regulation of microRNAs (such as miR-199a/214 and miR-10b involved in breast cancer invasiveness)⁵² and of genes linked to cancer progression.^{53,54} Namely, Twist1 is able to bind to the promoter of the proto-oncogene AKT2 to upregulate its

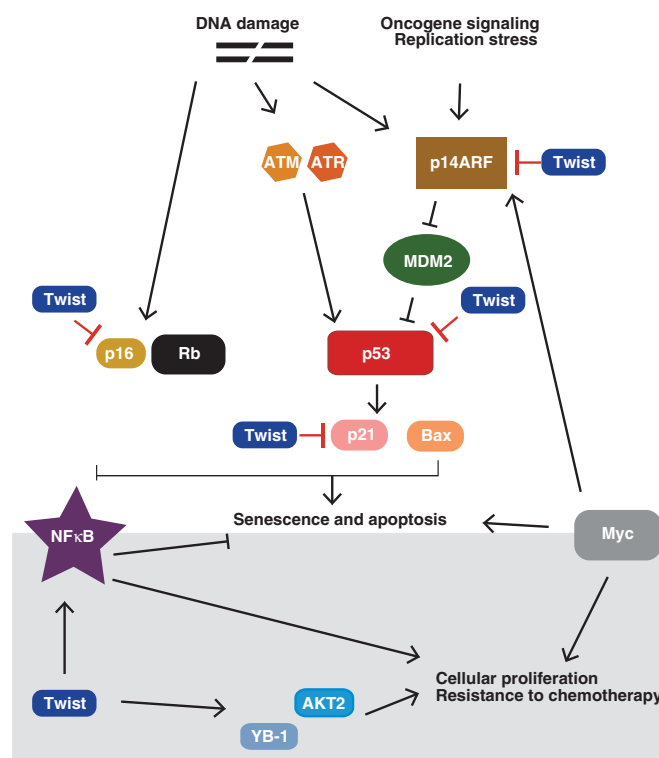


Figure 2. Targets of Twist proteins in the DNA damage response pathway. In healthy conditions, DNA damage triggers the activation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATR kinases that usually results in activation of p53, of its transcriptional targets cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (CIP/WAF1, CDKN1A) and/or Bax, and ultimately leads to senescence or apoptosis. DNA damage can also induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4A) and the tumor suppressor retinoblastoma (Rb) that will further stabilize senescence cell cycle arrest. p14ARF might also come into play during the DNA damage response and is additionally induced by cellular stresses such as oncogene signaling and replication stress. p14ARF is an upstream regulator of p53 that acts through repression of p53-inhibitor MDM2. Myc transcription factor family members promote cell growth and proliferation, but might at the same time induce p53-dependent (through p14ARF) and -independent apoptosis. In cancer cells where Twist1 or Twist2 expression is increased, they neutralize senescence and cell death through inhibition of both p53 and Rb tumor-suppressor pathways. Twist1–2 repress senescence through binding to E-boxes in the regulatory region of p21 and p16. They might also inhibit the expression of p14ARF. Furthermore, Twist1 is able to block the Myc-induced apoptotic response through modulation of the p14ARF–MDM2–p53 pathway. Conversely, they increase cellular proliferation and trigger resistance to chemotherapy through the upregulation of AKT2 and YB-1 and the activation of the antiapoptotic NF- κ B response.

expression, and to activate the transcription factor Y-box-binding protein 1 (YB-1) associated with cellular proliferation. Overexpression of YB-1 and AKT2 have been observed in several malignancies and linked to poor prognosis.^{53,54} In breast cancers, Twist1 oncogenic functions that promote EMT are controlled by its phosphorylation mediated by PKB/Akt, leading to modulation of TGF β 2 transcription and enhanced TGF β receptor signaling.²¹

Twist1 expression is also connected to cancer cell resistance to chemotherapeutic agents, such as taxol and vincristine that target microtubules, and that are used in nasopharyngeal, bladder, ovarian and prostate cancers.^{53,55–57} This acquired resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs triggered by Twist1 is partly because of activation of the antiapoptotic NF- κ B response.⁵⁸

Finally, Twist1–2 have also been implicated in metastasis formation through EMT, thereby facilitating cancer cell invasion.^{41,59} Twist1 induction of metastasis through EMT plays a

central role in epithelium-based cancers but may not be the most relevant pathological effect in hematological malignancies, because they derive from cells with intrinsic motility capacity.

Twist 1–2 in malignancies derived from the myeloid lineage *Myelodysplastic syndromes (MDS)*. MDS are clonal disorders of hematopoietic stem/precursor cells characterized by abnormal maturation and differentiation, an increasing resistance to proapoptotic signals and a high risk for MDS patients to progress to acute myeloid leukemia (AML).

Upregulation of TNF α is typically observed in MDS bone marrow (BM) and is associated with a decreased expression of Twist1 in stromal cells.⁶⁰ In contrast, Twist1 expression is augmented in the CD34⁺ hematopoietic stem cell compartment from MDS BMs.³⁴ This increase in Twist1 expression appears to be induced in hematopoietic precursors by stroma contact and more frequent in



advanced-stage compared with low-grade MDS. A physical interaction between endogenous Twist1 and p53 has been detected and associated with resistance to apoptosis through inhibition of proapoptotic protein Bax expression.³⁴ Furthermore, forced inhibition of Twist1 in myeloid cell lines and primary CD34⁺ MDS cells resulted in increased expression of p53 and Bax, and enhanced TNF α -triggered apoptosis (Table 2). Li *et al.*³⁴ also observed an inverse correlation between the protein levels of Twist1 and p53 phosphorylated at serine 46. In 2013, the same group established that interactions between Twist1-dependent miR-10 family member and p53 played a central role in regulating TNF α -mediated apoptosis in MDS clonal cells.⁶¹ They showed that miRs10a/b facilitated apoptotic responses and decreased cell proliferation through direct modulation of the p53 promoter and of downstream targets of NF- κ B after transcriptional activation by Twist1. Of note, Twist1 inhibition also increased apoptosis in cell lines displaying mutated p53, suggesting that Twist1 contributes to additional pathways in the apoptotic response to stroma in MDS that have yet to be defined.

Acute myeloid leukemia. AML is characterized by a rapid growth and an increased number of myeloid-derived blast cells that

accumulate in the BM, paired with an arrest in their maturation. This process interferes with hematopoiesis and frequently results in hematopoietic insufficiency.

N-Myc overexpression is frequently detected in AML.⁶² Similar to observations made in neuroblastoma, experiments in mice showed that Twist1 is upregulated in AML-expressing N-myc, therefore suggesting that Twist1-mediated disruption of the apoptotic response through the ARF/p53/MDM2 pathway could be involved in N-Myc-positive AML.⁶² (Table 2). Furthermore, studies on the myeloid leukemic cell line U937 showed that Twist1 expression activated by the PKB/Akt/mTor (mammalian target of rapamycin) pathway through the neutrophin receptor TrkC (tropomyosin-related kinase C) molecular network (implicated in leukemogenesis)⁶³ was involved in resistance to apoptosis,⁶⁴ whereas when activated by Axl, Twist1 expression was implicated in resistance to treatment.⁶⁵

Finally, plasma levels of TNF α , IL6 and IL10 are increased in AML patients.⁶⁶ IL6 level is inversely correlated to patient survival. IL6 signaling acts through STAT3/5 activation to promote survival in AML⁶⁷ and, in theory, this may lead to the activation of Twist1–2 expression. Importantly, deregulation of Twist1–2 expression in AML patients remains to be demonstrated.

Table 2. Functions of Twist1 and Twist2 in hematological malignancies

	Twist1	Twist2
Myeloid malignancies		
MDS	- Expressed in CD34⁺ hematopoietic stem cells³⁴; - Expression associated with disease stage - Inhibition of apoptosis - Interaction with p53, and Bax inhibition - Regulation of TNFα-mediated apoptosis^{34,61} through miR-10. - Modulator of unknown p53-independent pathway of apoptosis	NA
AML	- Upregulated in N-Myc⁺ AML⁶²; - Possible implication in resistance to apoptosis⁶³ and to treatment⁶⁵	- Hypermethylation of <i>twist2</i> promoter region in some cases of childhood AML¹⁰⁴; - Function unknown
CML	- Increased expression^{35,68}; - Associated with stage disease and treatment resistance.	- No hypermethylation of the <i>twist2</i> promoter¹⁰⁴
T-cell lymphoma		
CTCL	- Highly expressed in Sz, MF and CD30⁺ CTCL. - Correlated with MF and Sz disease stage^{77,78}; - Probable inhibition of apoptosis through association with c-Myc and p53.⁷⁹	- Highly expressed - Antiapoptotic role^{81,82} - Downregulation of CD7, galectin-1 receptor.
ALCL	- Highly expressed - Upregulated via STAT3 - Probable role in invasiveness and chemoresistance linked to phospho-Akt and Bmi-1⁹⁹	NA
B-cell lymphoma		
DLBCL, MzBCL, FL	- Overexpressed in DLBCL,⁹⁹ MzBCL and FL (unknown function) (Merindol <i>et al.</i>, this study; Figure 3a).	- Not overexpressed (Merindol <i>et al.</i>, this study; Figure 3b).
Leukemia		
ALL	NA	- Hypermethylation of <i>twist2</i> promoter region frequent in childhood ALL.¹⁰⁵ - Associated with loss of Twist2 expression - Loss associated with disease stage/relapse - Tumor-suppressor properties - Loss of Twist2 linked to cell growth and to resistance to apoptosis and chemotherapeutic agents. - Frequent promoter region methylation in mutated Ig V_H CLL subtypes - Associated with favorable prognosis.⁴⁴
CLL	NA	

Abbreviations: ALCL, anaplastic large cell lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; Ig, immunoglobulin; CML, chronic myeloid leukemia; CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; MF, mycosis fungoides; MzBCL, marginal zone B-cell lymphoma; NA, not available; STAT, signal transducer and activator of transcription; Sz, Sézary syndrome; TNF, tumor necrosis factor; V_H, variable heavy chain.

Chronic myelogenous or myeloid leukemia (CML). CML is a clonal stem cell disorder characterized by an increased number and unregulated growth of myeloid cells in the BM and accumulation of these cells in the blood. This disease is associated with a characteristic chromosomal translocation called the Philadelphia chromosome, consisting of a Bcr-Abl tyrosine kinase fusion.

In 2003, Tipping *et al.*⁶⁸ detected the expression of Twist1 in KCL22 CML cell lines in a genome-wide microarray analysis. Twist1 expression was further amplified in KCL22 clones that were resistant to Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI). In 2010, Cosset *et al.*³⁵ confirmed that Twist1 expression increased in CD34⁺ hematopoietic stem cells and CD34⁺ cells throughout CML disease progression. Its expression significantly decreased upon complete remission and increased again after relapse. Furthermore, they observed a 100-fold increase of Twist1 expression in TKI nonresponder compared with TKI responder samples (Table 2). The increase in Twist1 expression was specific to TKI-resistant patients in the CD34⁺ cells compartment. Silencing of Twist1 by RNA interference experiments in cell lines decreased cell number and viability in response to Imatinib, whereas overexpression of Twist1 led to improved Imatinib resistance of previously sensitive cell lines. Therefore, Twist1 seems to be implicated in resistance to TKI in cell lines and the authors suggest that Twist1 may be used as a novel predictive marker of TKI resistance in CML.

A recent study proposed a new role for Twist1 in CML. Xin *et al.*⁶⁹ studied differences between the CML cell lines K562 and the multidrug-resistant K562/A02 derived by enrichment through treatment with doxorubicin. They showed that Twist1 was highly expressed in the multidrug-resistant cell lines derived from K562. Moreover, twist1 knockdown decreased the expression of stem cell markers such as Oct4, Sox2 and Nanog in this multidrug-resistant cell line, suggesting that, in addition to participating in chemoresistance, Twist1 is involved in maintaining tumor-initiating or cancer stemness properties.

Twist1–2 in lymphoid lineage-derived malignancies

T-cell lymphoma

Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). CTCLs are a group of lymphoproliferative disorders characterized by localization of neoplastic T cells in the skin. Classical forms of CTCLs are plaque-type mycosis fungoides (MF) and Sézary syndrome (Sz). The link between MF and Sz remains controversial. Sz was described by Albert Sézary, it can arise *de novo* or evolve from MF and is considered a rare leukemic variant. Sz is characterized by erythroderma, peripheral lymphadenopathy and the presence of malignant T cells that are CD4⁺CD45RO⁺ and CD7⁺CD26⁺ in the skin, lymph nodes and peripheral blood, chronically activated and skewed toward T_H2 differentiation.⁷⁰ These T cells are derived from the same T-cell clone.⁷¹ MF is a slowly progressive disease (87% 5-year survival), whereas Sz is more aggressive with a poor prognosis (11% 5-year survival). In both diseases, chemotherapy and BM transplantation are not curative and do not significantly improve survival.

Twist1. Sz and MF are defined by aberrations in four pathways: (1) evasion of activation-induced cell death, (2) T_H2-biased lymphocyte differentiation, (3) TGF β receptor expression and (4) modulation of TNF receptor ligands (reviewed in Dulmage *et al.*⁷⁰). Molecularly, typical observations of these diseases include the constitutive activation of STAT3^{72,73} and NK- κ B,⁷⁴ decreased expression of TGF β receptor II, of downstream modulators such as SMAD3/5 and of its ligand TGF β 1,⁷⁵ diminished detection of p15 and p16⁷⁶ and dysregulation of the c-Myc and of TNF-associated pathways.

All these molecular alterations point toward a possible implication of Twist1. In 2004, van Doorn *et al.*⁷⁷ first identified high overexpression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and of

the transcription factor Twist1 in Sz⁷⁸ (Table 2). Similar results were observed in a subset of patients with MF and with CD30-negative primary CTCL. Although they did not perform any mechanistic experiments, the authors proposed that Twist1 could block c-Myc-induced apoptosis by antagonizing the p53 pathway. In 2012, a study by Goswami *et al.*⁷⁹ showed that Twist1 expression was indeed correlated with MF and Sz stages. Moreover, they observed an association between increased Twist1 and c-Myc expression and abnormal p53 expression. The precise role of Twist1 and of other Sz- and MF-specific upregulated proteins (that is, PLS3, KIR3DL2, NKp36) in CTCL remains to be characterized.⁸⁰

Twist2. Similar to conclusions from experiments in primary T lymphocytes, studies by SH Koh *et al.*^{19,32} suggested that Twist2, like Twist1, plays an antiapoptotic role in T-cell lymphoma but through a distinct pathway (Table 2). Indeed, they showed that Twist2 was overexpressed in mature T-cell lymphoma cells and specifically highly expressed in Sz cells. Ectopic expression of Twist2 was able to downregulate the expression of the galectin-1 receptor CD7 through induction of chromatin deacetylation. This led to a decrease in galectin-1-mediated apoptosis in activated T cells that promoted malignant T-cell accumulation and progression of T-cell lymphoma. Accordingly, CD7 expression is dramatically downregulated in Sz and galectin-1-induced apoptosis by CD7 is inhibited.^{81,82}

Of note, downregulation of CD7 is also related to the progression of adult T-cell lymphoma/leukemia where galectin-3-induced apoptosis is inhibited,⁸³ although Twist2 expression has not yet been detected in this context.

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL). ALK⁺ ALCL represents a small subset of non-Hodgkin's T-cell lymphoma characterized by a specific chromosomal translocation and the fusion of nucleophomin (NPM) and anaplastic large cell lymphoma kinase (ALK) genes in the majority of cases. This leads to ubiquitous expression of ALK, whose expression is normally restricted to the brain and nervous system. NPM-ALK promotes oncogenesis by activating cellular signaling proteins, including STAT3, MEK/ERK, mTOR and (PI3K)/Akt (reviewed in Amin *et al.*⁸⁴ and Chiarle *et al.*⁸⁵). The activation of these pathways has been linked to Twist1 expression in other malignancies as well as to increased cell proliferation and resistance to apoptosis.

NPM-ALK promotes tyrosine phosphorylation of STAT2 on Y705, essential for dimerization and activation of STAT3.⁸⁶ Inhibition of STAT3 leads to apoptosis and cell cycle arrest in ALK⁺ ALCL cell lines and is required for its lymphomagenesis.^{87,88} In 2012, Zhang *et al.*⁸⁹ reported that STAT3 directly upregulated Twist1 and that Twist1 was highly expressed in three ALK⁺ ALCL cell lines and *ex vivo* in three ALK⁺ ALCL tumor-derived samples (Table 2). They performed functional assays that suggested that Twist1 contributes to the invasiveness of ALK⁺ ALCL. In two out of three cell lines, Twist1 was linked to expression of phospho-Akt and Bmi-1 and downregulation of p66Shc (a member of Src homology and collagen homology family). Twist1 knockdown resulted in increased sensitivity to the chemotherapeutic agent ALK inhibitor Crizotinib in those two cell lines. These results need to be confirmed on a larger population of patients. Nevertheless, they suggest a key role for Twist1 as a regulator of apoptosis and resistance to treatment in this T-cell malignancy.

In addition, an *in vitro* study by Degerman *et al.*⁹⁰ hints at a role for Twist1 during spontaneous oncogenesis of two Nijmegen breakage syndrome T-cell cultures established following mitogenic stimulation in the presence of IL-2. Twist1 expression is strongly increased in cell lines undergoing immortalization and appears to be of significance for senescence bypass in T cells.

B-cell lymphoma

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), marginal zone B-cell lymphoma and follicular lymphoma. DLBCL is the most common subtype of

non-Hodgkin's lymphoma among adults with an overall survival at 5 years of 60%. Marginal zone B-cell lymphoma and follicular lymphoma are two other types of B-cell lymphoma, the latter being the second most common non-Hodgkin's lymphoma.

DLBCL arises from normal B cells or from the transformation of other types of lymphoma and leukemia. The disease is characterized by an aggressive and rapidly growing tumor that can arise in any part of the body. DLBCL is heterogeneous and encompasses a diverse set of clinical presentations and diagnosis. With the help of gene expression profiling, DLBCL can be divided into germinal centre B-cell-like, activated B-cell-like and primary mediastinal B cell-like subgroups.^{91,92}

The first suggestions of a possible Twist1 dysregulation came from genetic studies performed by Davis *et al.*⁹³ showing that the NF- κ B pathway was constitutively activated in activated B-cell-like and primary mediastinal B cell-like DLBCL. In addition, the expression of STAT3 and IL6 is frequently triggered in activated B-cell-like subtypes.⁹⁴ c-Myc overexpression because of chromosomal rearrangement or translocation is observed in ~10% of DLBCL (regardless of the subtype) and associated with poor prognosis.^{95–98}

In 2012, Lemma *et al.*⁹⁹ detected the expression of Twist1 in the nucleus of the majority of DLBCL samples (83/99) by immunohistochemical staining. Twist1 expression correlated with Slug and Zeb1 expression, two other transcription factors associated with EMT⁹⁹ (Table 2). Nevertheless, the expression of Twist1 could not be associated with any prognostic value. Interestingly, overexpression of YB-1, a known target of Twist1 implicated in cellular proliferation, has also been described and linked to poor prognosis and rituximab resistance in DLBCL samples.^{100,101}

With the aim of investigating a possible role of Twist1–2 in B-cell lymphoma, we performed real-time Q-PCR on samples derived from Origene (Lymphoma cDNA Array II LYRT102, Origene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) (Figure 3). A description of each sample is found at www.origene.com/assets/documents/TissueScan/LYRT102.xls. As a positive control, an analysis of Twist1 expression from a sample of a patient with MF was included. Reference values used as healthy controls were obtained from six

samples of lymph nodes and spleen containing 100% normal cells, originally part of the mRNA samples present on the LYRT102 plate. We detected an increased expression of Twist1 in DLBCL samples and also in follicular and marginal zone B-cell lymphomas samples (although results were statistically significant only for follicular and marginal zone B-cell lymphoma compared with spleen and lymph node controls of normal appearance; Figure 3a). Twist2 expression was positively correlated with Twist1 expression. Although a high expression of Twist2 was detected in some patients in all three types of lymphoma, no significant overexpression of Twist2 could be measured compared with controls (Figure 3b).

In conclusion, Twist1 seems to be overexpressed in several types of B-cell lymphomas. Given its potential as a therapeutic target in other types of cancer, further investigations are needed to characterize its function and its regulation.

Leukemia. Although there are considerable data showing Twist1–2 oncogenic properties in T-cell lymphoma and in myeloid leukemia, publications on their implication in lymphoid leukemia remain sporadic and results remain to be confirmed.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL). ALL is the most common type of leukemia in childhood and still accounts for 25% of all deaths from pediatric cancers. In adults, it is even more difficult to treat with a 5-year survival of 40%. It can derive from both B lymphocytes and T cells.

In several types of cancer such as leukemia, differences in biology and survival between patients may be due, in part, to inappropriate epigenetic regulation, such as silencing of tumor suppressor genes through DNA methylation.^{102,103}

Preliminary evidence suggesting that Twist2 might play a role in ALL came from observations of specific dysregulated pathways of transcription factors that are known targets of Twist2, namely RUNX1 (fused with ETV6 in 25% of childhood ALL) and NF- κ B.³¹ In 2012, Thathia *et al.*¹⁰⁴ identified that hypermethylation of the *twist2* promoter is frequent in both childhood (30 of 54 including 28 of 43 B-ALL and 2 of 7 T-ALL) and adult ALL (52 of 77 patients including 27 of 39 B-ALL and 13 of 15 T-ALL), whereas it was only moderately observed in childhood AML (4 of 28 cases) and rarely

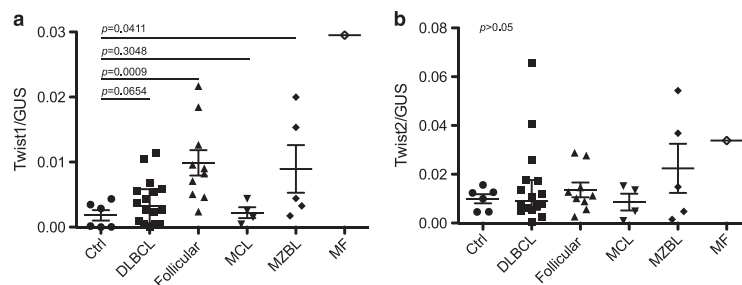


Figure 3. Twist1–2 mRNA levels in several types of non-Hodgkin's B-cell lymphomas. The mRNA levels of *twist1* and *twist2* were measured by real-time PCR using the Applied Biosystems StepOnePlus Realtime PCR systems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 35 amplification rounds in Fast runs using the Fast SYBR Green Master mix (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Basel, Switzerland). CTRL ($n = 6$), healthy control samples; DLBCL ($n = 16$), diffuse large B-cell lymphoma samples; follicular ($n = 10$), follicular lymphoma samples; MCL ($n = 4$), mantle cell lymphoma samples; MF ($n = 1$), mycosis fungoides sample; MZBL ($n = 5$), marginal zone B-cell lymphoma samples. Gus (β -Glucuronidase) was the endogenous control gene used to normalize DNA quantity. Relative expression was calculated as $2^{-(Ct_{\text{mean Twist1 or 2}} - Ct_{\text{mean Gus}})}$. Statistics were performed independently between groups and control samples using the one-tailed Mann–Whitney *t*-test. (a) *twist1* relative expression. *twist1* expression was significantly higher in follicular lymphoma and in marginal zone B-cell lymphoma. It was also higher in DLBCL, although it did not reach statistical significance. Of note, when comparisons were further separated in tissue-specific DLBCL samples, that is, that came either from spleen or from lymph nodes and compared with tissue-matched controls, results reached statistical significance ($P = 0.0286$ between healthy and DLBCL samples derived from lymph nodes and $P = 0.0357$ between healthy and DLBCL samples derived from spleen, data not shown). As *twist1* expression is known to be upregulated in MF, one sample derived from a patient with MF was included as a positive reference value in the figure. (b) *twist2* relative expression. *twist2* expression was measured in the same samples as in Figure 1a. No statistically significant difference could be observed between groups. Of note, high variability was observed in DLBCL- and MZBL-derived samples.

in CLL (5 of 110 cases). Noteworthy, *Twist2* hypermethylation was not observed in CML and adult AML. *Twist2* 5' upstream regulatory region hypermethylation was more frequent in ETV6-RUNX1-positive childhood ALL than in other childhood ALL cases (Table 2). Moreover, *twist2* hypermethylation was especially frequent in relapsed adult ALL (20 of 22 cases), and the corresponding frequencies of samples exhibiting hypermethylated *twist2* was higher following relapse than at the time of diagnosis.¹⁰⁴

Hypermethylation resulted in loss of *Twist2* expression in patient samples and ALL cell lines. Interestingly, restoration of *Twist2* expression through transfection of Nalm6 and Reh ALL cell lines resulted in a dramatic inhibition of cell growth (aggravated by decamethasone treatment), associated with induction of apoptosis in ETV6-RUNX1⁺ Reh cell lines.¹⁰⁴ The authors propose that *Twist2* inhibition of cell growth could be mediated in some cases through inactivation of RUNX1 because the latter has been shown to increase proliferation and enhance B-cell survival¹⁰⁵; although no experiments were conducted to test this. Finally, re-expression of *Twist2* leads to an increased sensitivity to the chemotherapeutic agents etoposide and daunorubicin. The authors hypothesize that chemotherapeutic sensitivity modulation by *Twist2* is mediated through NF- κ B inhibition, because increased expression of the latter is correlated with chemoresistance.

In summary, in opposition to its role in T-cell lymphoma and in myeloid leukemia, *Twist2* appears to exhibit tumor-suppressor properties in ALL.

Chronic lymphocytic leukemia. CLL is the most common type of leukemia, displaying a great variability with regard to clinical course and survival. It is characterized by slow and uncontrolled proliferation with disrupted apoptosis of a clonal B cell that results in the accumulation of cells and disruption of normal immune function. Prognostic factors associated with worsened survival include expression of ZAP70 and CD38, chromosomal aberrations (reviewed in Stilgenbauer *et al*¹⁰⁶) and chromosomal deletions,^{107,108} p53 mutations¹⁰⁹ and absence of somatic mutations in genes coding for immunoglobulin variable heavy chain (Ig V_H).^{110,111} In addition, a high frequency of patients with unmutated Ig V_H CLL exhibit p53 dysfunction.

DNA methylation is also implicated in the biology of CLL.¹¹² In 2005, Raval *et al.*⁴⁴ demonstrated that the *Twist2* promoter was frequently methylated in patients exhibiting mutated Ig V_H subtypes of CLL (associated with a favorable prognosis) but not in patients that exhibited unmutated Ig V_H subtypes (associated with a poor prognosis) (Table 2). Methylation resulted in *twist2* silencing in mutated subtypes, whereas *Twist2* was expressed in unmutated subtypes. The authors suggest that the expression of *Twist2* in unmutated Ig V_H patients (with unmethylated *twist2*) could lead to disruption of the p53 pathway as observed in several other types of cancer, although they did not confirm this experimentally. In conclusion, parallel to what is seen in T-cell lymphoma but in opposition to observations in ALL, the expression of *Twist2* in CLL could be associated with a poor prognosis.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES: OTHER BHLH PROTEINS IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Twist1-2-mediated gene expression modulation is intrinsically linked to the abundance of other bHLH members such as E2A and Id proteins. Interestingly, deregulation of expression of these proteins has been observed in various hematological malignancies. For instance, E2A^{ko} mice display a high risk of developing T-cell tumors, as do E2A^{ko}Id1^{ko} mice.²⁶ E47 knockdown experiments in T-cell lymphoma cell lines linked E47 deficiencies to the development of T-cell malignancy.¹¹³ Loss of expression of E2A, or its sequestration by Id2, has been linked to resistance to apoptosis in primary effusion lymphoma,¹¹⁴ to loss of B-cell phenotype and reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin's

lymphoma.¹¹⁵ Id1 is frequently overexpressed in various malignancies and its deregulated expression in mice has been associated with MDS development and immortalization of myeloid progenitors.¹¹⁶ In AML, high expression of Id1 is implicated in leukemic cell proliferation and has been associated with poor prognosis.¹¹⁷ Id4 silencing is systematic in CLL and MDS and plays a role in its pathogenesis.^{118,119} In contrast, Id4 seems to act as an oncogene in B cell-derived malignancies such as ALL.^{120,121} Unfortunately, *Twist1-2* function was not investigated in the studies mentioned herein.

In conclusion, numerous questions remain to be addressed concerning the role of *Twist1-2* in hematological malignancies. There is still a disturbing paucity of data on *Twist2* implication in blood malignancies and on the role of *Twist1-2* in non-T-cell lymphoma/leukemia. As potential therapeutic targets and as central regulators of apoptosis and senescence, large efforts should be undertaken to promptly clarify the role of *Twist1-2* and their partners in these types of cancer.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

NM was supported by a fellowship from the ARC foundation (fondation ARC pour la recherche sur le cancer) and AR by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer. This work was supported by institutional grants from INSERM, Université de Lyon (to NB) and by a specific grant from the Cancéropole Grand Sud-Ouest (to NB).

REFERENCES

- 1 el Ghouzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D *et al*. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**: 42–46.
- 2 Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI *et al*. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**: 36–41.
- 3 Hebrok M, Wertz K, Fuchtbauer EM. M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev Biol* 1994; **165**: 537–544.
- 4 Lee YS, Lee HH, Park J, Yoo EJ, Glackin CA, Choi YI *et al*. Twist2, a novel ADD1/SREBP1c interacting protein, represses the transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 7165–7174.
- 5 Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 1996; **272**: 1476–1480.
- 6 Murray SS, Glackin CA, Winters KA, Gazit D, Kahn AJ, Murray EJ. Expression of helix-loop-helix regulatory genes during differentiation of mouse osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1992; **7**: 1131–1138.
- 7 Tükel T, Šosić D, Al-Gazali LI, Erazo M, Casasnovas J, Franco HL *et al*. Homozygous nonsense mutations in TWIST2 cause Setleis syndrome. *Am J Hum Genet* 2010; **87**: 289–296.
- 8 Sosis D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* 2003; **112**: 169–180.
- 9 Thisse C, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Thisse B. Sequence-specific transactivation of the Drosophila twist gene by the dorsal gene product. *Cell* 1991; **65**: 1191–1201.
- 10 Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, Wang Q, Coppola D, Mansour M *et al*. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14665–14673.
- 11 Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AM. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* 2003; **63**: 1906–1913.
- 12 Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ *et al*. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 295–305.
- 13 Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, Groot AJ, Plasterk RH, Shvarts A *et al*. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene* 2008; **27**: 1501–1510.
- 14 Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY *et al*. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 1999; **96**: 405–413.



- 15 Gong XQ, Li L. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12310–12317.
- 16 Pan D, Fujimoto M, Lopes A, Wang YX. Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism. *Cell* 2009; **137**: 73–86.
- 17 Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989; **56**: 777–783.
- 18 Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sasic D, Hong N et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 2004; **6**: 423–435.
- 19 Koh HS, Lee C, Lee KS, Ham CS, Seong RH, Kim SS et al. CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis of immature thymocytes are directly regulated by NF-kappaB upon T-cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **370**: 149–153.
- 20 Hong J, Zhou J, Fu J, He T, Qin J, Wang L et al. Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res* 2011; **71**: 3980–3990.
- 21 Xue G, Restuccia DF, Lan Q, Hynx D, Dimhofer S, Hess D et al. Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF-beta signaling axes. *Cancer Discov* 2012; **2**: 248–259.
- 22 Firulli BA, Howard MJ, McDaid JR, McIlreavey L, Dionne KM, Centonze VE et al. PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell* 2003; **12**: 1225–1237.
- 23 Firulli AB, Conway SJ. Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr Med Chem* 2008; **15**: 2641–2647. Review.
- 24 Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, Restuccia DF, Hemmings BA. PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* 2010; **29**: 3554–3565.
- 25 Castanon I, Von Stetina S, Kass J, Baylies MK. Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during Drosophila mesoderm development. *Development* 2001; **128**: 3145–3159.
- 26 Yan W, Young AZ, Soares VC, Kelley R, Benezra R, Zhuang Y. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 7317–7327.
- 27 Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Mercado MA, Dowell K, Yang X et al. Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev Biol* 2008; **318**: 323–334.
- 28 Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990; **61**: 49–59.
- 29 Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H et al. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1350–1357.
- 30 Danciu TE, Whitman M. Oxidative stress drives disulfide bond formation between basic helix-loop-helix transcription factors. *J Cell Biochem* 2010; **109**: 417–424.
- 31 Sharabi AB, Aldrich M, Sasic D, Olson EN, Friedman AD, Lee SH et al. Twist-2 controls myeloid lineage development and function. *PLoS Biol* 2008; **6**: e316.
- 32 Koh HS, Lee C, Lee KS, Park EJ, Seong RH, Hong S et al. Twist2 regulates CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis in mature T-cells. *Mol Cells* 2009; **28**: 553–558.
- 33 Sharif MN, Sasic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN et al. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med* 2006; **203**: 1891–1901.
- 34 Li X, Marcondes AM, Gooley TA, Deeg HJ. The helix-loop-helix transcription factor TWIST is dysregulated in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2010; **116**: 2304–2314.
- 35 Cosset E, Hamdan G, Jeanpierre S, Voeltzel T, Sagorny K, Hayette S et al. Deregulation of TWIST-1 in the CD34+ compartment represents a novel prognostic factor in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011; **117**: 1673–1676.
- 36 Wang SM, Coljee VW, Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ, Sierra F. Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 1997; **187**: 83–92.
- 37 Mabbott NA, Kenneth Baillie J, Kobayashi A, Donaldson DS, Ohmori H, Yoon SO et al. Expression of mesenchyme-specific gene signatures by follicular dendritic cells: insights from the meta-analysis of microarray data from multiple mouse cell populations. *Immunology* 2011; **133**: 482–498.
- 38 Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008; **73**: 975–983. Review.
- 39 Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010; **130**: 166–171. Review.
- 40 Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Loddenkemper C, Loxberg MH et al. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J Exp Med* 2008; **205**: 1889–1901.
- 41 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; **117**: 927–939.
- 42 Pham D, Vincentz JW, Firulli AB, Kaplan MH. Twist1 regulates Ifng expression in Th1 cells by interfering with Runx3 function. *J Immunol* 2012; **189**: 832–840.
- 43 Pham D, Walline CC, Hollister K, Dent AL, Blum JS, Firulli AB et al. The transcription factor Twist1 limits T helper 17 and T follicular helper cell development by repressing the gene encoding the interleukin-6 receptor alpha chain. *J Biol Chem* 2013; **288**: 27423–27433.
- 44 Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Lyanarachchi S, Young DC et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 3877–3885.
- 45 Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 4598–4606.
- 46 Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer* 2006; **94**: 13–17. Review.
- 47 Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008; **14**: 79–89.
- 48 Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 2207–2217.
- 49 Stasinopoulos IA, Mironchik Y, Raman A, Wildes F, Winnard Jr P, Raman V. HoxA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 2294–2299.
- 50 Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A et al. Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* 2008; **27**: 5543–5553.
- 51 Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004; **6**: 625–630.
- 52 Haque I, Banerjee S, Mehta S, De A, Majumder M, Mayo MS et al. Cysteine-rich 61-connective tissue growth factor-nephroblastoma-overexpressed 5 (CCNS)/Wnt-1-induced signaling protein-2 (WSP-2) regulates microRNA-10b via hypoxia-inducible factor-1alpha-TWIST signaling networks in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2011; **286**: 43475–43485.
- 53 Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 2007; **67**: 1979–1987.
- 54 Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A et al. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res* 2008; **68**: 98–105.
- 55 Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT et al. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene* 2004; **23**: 474–482.
- 56 Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; **120**: 1891–1898.
- 57 Zhan X, Feng X, Kong Y, Chen Y, Tan W. JNK signaling maintains the mesenchymal properties of multi-drug resistant human epidermoid carcinoma KB cells through snail and twist1. *BMC Cancer* 2013; **13**: 180.
- 58 Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Knabb JR, Papa S, Kuntzen C et al. Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 3920–3935.
- 59 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; **139**: 871–890. Review.
- 60 Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M, Pogossova-Agadjanyan E, Abbasi N, Radich JP et al. Tumour necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: clues to the pathophysiology of MDS? *Br J Haematol* 2008; **140**: 444–453.
- 61 Li X, Xu F, Chang C, Byon J, Papayannopoulou T, Deeg HJ et al. Transcriptional regulation of miR-10a/b by TWIST-1 in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2013; **98**: 414–419.
- 62 Kawagoe H, Kandilci A, Kranenburg TA, Grosveld GC. Overexpression of N-Myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. *Cancer Res* 2007; **67**: 10677–10685.
- 63 Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Morishita K, Suzuki K, Sato Y et al. Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 1999; **93**: 1355–1363.

- 64 Kim MS, Kim GM, Choi YJ, Kim HJ, Kim YJ, Jin W. TrkC promotes survival and growth of leukemia cells through Akt-mTOR-dependent up-regulation of PLK-1 and Twist-1. *Mol Cells* 2013; **36**: 177–184.
- 65 Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT et al. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 2008; **268**: 314–324.
- 66 Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Bañas H et al. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine* 2013; **61**: 885–891.
- 67 Redell MS, Ruiz MJ, Gerbing RB, Alonzo TA, Lange BJ, Twardy DJ et al. FACS analysis of Stat3/5 signaling reveals sensitivity to G-CSF and IL-6 as a significant prognostic factor in pediatric AML: a Children's Oncology Group report. *Blood* 2013; **121**: 1083–1093.
- 68 Tipping AJ, Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate. *Exp Hematol* 2003; **31**: 1073–1080.
- 69 Xin H, Kong Y, Jiang X, Wang K, Qin X, Miao ZH et al. Multi-drug-resistant cells enriched from chronic myeloid leukemia cells by Doxorubicin possess tumor-initiating-cell properties. *J Pharmacol Sci* 2013; **122**: 299–304.
- 70 Dulmage BO, Geskin LJ. Lessons learned from gene expression profiling of cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2013; **169**: 1188–1197. Review.
- 71 Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdt S et al. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol* 1999; **188**: 146–154.
- 72 Eriksen KW, Kaltoft K, Mikkelsen G, Nielsen M, Zhang Q, Geisler C et al. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia* 2001; **15**: 787–793.
- 73 Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC et al. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9148–9153.
- 74 Izbán KF, Ergin M, Qin JZ, Martinez RL, Pooley RJ JR, Saeed S et al. Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum Pathol* 2000; **31**: 1482–1490.
- 75 Kadin ME, Cavaille-Coll MW, Gertz R, Massagué J, Cheifetz S, George D. Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6002–6006.
- 76 Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G et al. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Invest Dermatol* 2002; **118**: 493–499.
- 77 van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH, Out-Luiting JJ, van der Raaij-Helmer EM, Willemze R et al. Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sézary syndrome identified by gene expression analysis. *Cancer Res* 2004; **64**: 5578–5586.
- 78 Ni X, Richmond HM, Liao XM, Decker WK, Shiue LH, Shpall EJ et al. Induction of T-cell responses against cutaneous T-cell lymphomas ex vivo by autologous dendritic cells transfected with amplified tumor mRNA. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2631–2639.
- 79 Goswami M, Duvic M, Dougherty A, Ni X. Increased Twist expression in advanced stage of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Cutan Pathol* 2012; **39**: 500–507.
- 80 Michel L, Jean-Louis F, Begue E, Bensussan A, Bagot M. Use of PLS3, Twist, CD158k/KIR3DL2, and NKp46 gene expression combination for reliable Sézary syndrome diagnosis. *Blood* 2013; **121**: 1477–1478.
- 81 Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J Immunol* 2000; **165**: 2331–2334.
- 82 Rapp G, Abken H, Muche JM, Sterry W, Tilgen W, André S et al. CD4+ CD7-leukemic T cells from patients with Sézary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia* 2002; **16**: 840–845.
- 83 Liu TY, Chen CY, Tien HF, Lin CW. Loss of CD7, independent of galectin-3 expression, implies a worse prognosis in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Histopathology* 2009; **54**: 214–220.
- 84 Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 2007; **110**: 2259–2267. Review.
- 85 Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 11–23. Review.
- 86 Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 2002; **21**: 1038–1047.
- 87 Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 2004; **23**: 5426–5434.
- 88 Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med* 2005; **11**: 623–629.
- 89 Zhang J, Wang P, Wu F, Li M, Sharon D, Ingham RJ et al. Aberrant expression of the transcriptional factor Twist1 promotes invasiveness in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cell Signal* 2012; **24**: 852–858.
- 90 Degerman S, Siwicki JK, Osterman P, Lafferty-Whyte K, Keith WN, Roos G. Telomerase upregulation is a postcrisis event during senescence bypass and immortalization of two Nijmegen breakage syndrome T cell cultures. *Aging Cell* 2010; **9**: 220–235.
- 91 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**: 503–511.
- 92 Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 9991–9996.
- 93 Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 1861–1874.
- 94 Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-(kappa)B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008; **111**: 3701–3713.
- 95 Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 3360–3365.
- 96 Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* 2008; **22**: 2226–2229.
- 97 Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2008; **100**: 233–237.
- 98 Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; **114**: 3533–3537.
- 99 Lemma S, Karihtala P, Haapasara KM, Jantunen E, Soini Y, Bloigu R et al. Biological roles and prognostic values of the epithelial-mesenchymal transition-mediating transcription factors Twist, ZEB1 and Slug in diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2013; **62**: 326–333.
- 100 Hanzawa K, Momose M, Higashi M, Tokuhira M, Watanabe R, Kajino K et al. Y-box binding protein-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma: an impact on prognosis in the rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2010; **51**: 2054–2062.
- 101 Xu W, Zhou L, Qin R, Tang H, Shen H. Nuclear expression of YB-1 in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Eur J Haematol* 2009; **83**: 313–319.
- 102 Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 1999; **94**: 2445–2451.
- 103 Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood* 2000; **95**: 3208–3213.
- 104 Thathia SH, Ferguson S, Gautrey HE, van Otterdijk SD, Hili M, Rand V et al. Epigenetic inactivation of TWIST2 in acute lymphoblastic leukemia modulates proliferation, cell survival and chemosensitivity. *Haematologica* 2012; **97**: 371–378.
- 105 Blyth K, Slater N, Hanlon L, Bell M, Mackay N, Stewart M et al. Runx1 promotes B-cell survival and lymphoma development. *Blood Cells Mol Dis* 2009; **43**: 12–19.
- 106 Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H. German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002; **16**: 993–1007. Review.
- 107 Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; **85**: 1580–1589.
- 108 Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999; **353**: 26–29.



- 109 Lin K, Manocha S, Harris RJ, Matrai Z, Sherrington PD, Pettitt AR. High frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the VH3-21 gene segment. *Blood* 2003; **102**: 1145–1146.
- 110 Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL *et al*. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840–1847.
- 111 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848–1854.
- 112 Rush LJ, Raval A, Funchain P, Johnson AJ, Smith L, Lucas DM *et al*. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* 2004; **64**: 2424–2433.
- 113 Schwartz R, Engel I, Fallahi-Sichani M, Petrie HT, Murre C. Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 9976–9981.
- 114 Lietz A, Janz M, Sigvardsson M, Jundt F, Dörken B, Mathas S. Loss of bHLH transcription factor E2A activity in primary effusion lymphoma confers resistance to apoptosis. *Br J Haematol* 2007; **137**: 342–348.
- 115 Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S *et al*. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol* 2006; **7**: 207–215.
- 116 Suh HC, Leeansaksiri W, Ji M, Klarmann KD, Renn K, Gooya J *et al*. Id1 immortalizes hematopoietic progenitors in vitro and promotes a myeloproliferative disease in vivo. *Oncogene* 2008; **27**: 5612–5623.
- 117 Yu WP, Scott SA, Dong WF. Induction of ID1 expression and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor (trichostatin A) in human acute myeloid leukaemic cells. *Cell Prolif* 2008; **41**: 86–97.
- 118 Chen SS, Claus R, Lucas DM, Yu L, Qian J, Ruppert AS *et al*. Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL. *Blood* 2011; **117**: 862–871.
- 119 Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. ID4 methylation predicts high risk of leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2010; **34**: 598–604.
- 120 Bellido M, Aventin A, Lasa A, Estivill C, Carnicer MJ, Pons C *et al*. Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003; **88**: 994–1001.
- 121 Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ *et al*. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* 2005; **37**: 265–274.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

BIBLIOGRAPHIE

- Akagi, T., Ono, H., and Shimotohno, K. (1996). Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Oncogene* 12, 1645–1652.
- Albesiano, E., Messmer, B.T., Damle, R.N., Allen, S.L., Rai, K.R., and Chiorazzi, N. (2003). Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood* 102, 3333–3339.
- Albrecht, H., Shakhov, A.N., and Jongeneel, C.V. (1992). trans activation of the tumor necrosis factor alpha promoter by the human T-cell leukemia virus type I Tax1 protein. *J. Virol.* 66, 6191–6193.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79–89.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699–702.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* 205, 1357–1368.
- Arima, N., Molitor, J.A., Smith, M.R., Kim, J.H., Daitoku, Y., and Greene, W.C. (1991). Human T-cell leukemia virus type I Tax induces expression of the Rel-related family of kappa B enhancer-binding proteins: evidence for a pretranslational component of regulation. *J. Virol.* 65, 6892–6899.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J.Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y., and Shimotohno, K. (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* 19, 1491–1499.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining. *J. Biol. Chem.* 279, 55117–55126.
- Avesani, F., Romanelli, M.G., Turci, M., Di Gennaro, G., Sampaio, C., Bidoia, C., Bertazzoni, U., and Bex, F. (2010). Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF- κ B activation. *Virology* 408, 39–48.
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., and Waldmann, T.A. (1998). Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2452–2457.
- Ballard, D.W., Böhnlein, E., Lowenthal, J.W., Wano, Y., Franza, B.R., and Greene, W.C. (1988). HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 241, 1652–1655.
- Banerjee, P., Sieburg, M., Samuelson, E., and Feuer, G. (2008). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection of CD34+ hematopoietic progenitor cells induces cell cycle arrest by modulation of p21(cip1/waf1) and survivin. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 3047–3058.

- Baranger, A.M., Palmer, C.R., Hamm, M.K., Giebler, H.A., Brauweiler, A., Nyborg, J.K., and Schepartz, A. (1995). Mechanism of DNA-binding enhancement by the human T-cell leukaemia virus transactivator Tax. *Nature* 376, 606–608.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633–637.
- Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 278, 43620–43627.
- Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2003). H2AX May Function as an Anchor to Hold Broken Chromosomal DNA Ends in Close Proximity. *Cell Cycle* 3, 147–148.
- Basso, K., Schneider, C., Shen, Q., Holmes, A.B., Setty, M., Leslie, C., and Dalla-Favera, R. (2012). BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155. *J. Exp. Med.* 209, 2455–2465.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511.
- Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Carlos Ramos, J., Tortevoe, P., Otroock, Z., Taylor, G., Gessain, A., Harrington, W., Panelatti, G., and 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. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 4177–4183.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., and Baldwin, A.S. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.* 6, 1899–1913.
- Begum, N.A., Kinoshita, K., Kakazu, N., Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Biniszkievicz, D., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Honjo, T. (2004). Uracil DNA glycosylase activity is dispensable for immunoglobulin class switch. *Science* 305, 1160–1163.
- Bekerman, E., Jeon, D., Ardolino, M., and Coscoy, L. (2013). A role for host activation-induced cytidine deaminase in innate immune defense against KSHV. *PLoS Pathog.* 9, e1003748.
- Bergquist, A., Ekbom, A., Olsson, R., Kornfeldt, D., Lööf, L., Danielsson, Å., Hultcrantz, R., Lindgren, S., Prytz, H., Sandberg-Gertzén, H., et al. (2002). Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* 36, 321–327.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., and Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* 71, 3484–3497.
- Bex, F., Yin, M.J., Burny, A., and Gaynor, R.B. (1998). Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2392–2405.
- Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S.Y., and Blau, H.M. (2010).

Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042–1047.

Bittencourt, A.L., Primo, J., and Oliveira, M.F.P. de (2006). Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. *J. Pediatr. (Rio J.)* 82, 411–420.

Boboila, C., Alt, F.W., and Schwer, B. (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* 116, 1–49.

Bombardieri, M., Kam, N.-W., Brentano, F., Choi, K., Filer, A., Kyburz, D., McInnes, I.B., Gay, S., Buckley, C., and Pitzalis, C. (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1857–1865.

Borchert, G.M., Holton, N.W., and Larson, E.D. (2011). Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer* 11, 347.

Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5, 76.

Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4102–4107.

Brar, S.S., Watson, M., and Diaz, M. (2004). Activation-induced Cytosine Deaminase (AID) Is Actively Exported out of the Nucleus but Retained by the Induction of DNA Breaks. *J. Biol. Chem.* 279, 26395–26401.

Brien, G., Trescol-Biemont, M.-C., and Bonnefoy-Bérard, N. (2007). Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene* 26, 5828–5832.

Brien, G., Debaud, A.-L., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M.-C., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F.M., Haser, R., et al. (2009). C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J. Biol. Chem.* 284, 30257–30263.

Burns, M.B., Temiz, N.A., and Harris, R.S. (2013a). Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat. Genet.* 45, 977–983.

Burns, M.B., Lackey, L., Carpenter, M.A., Rathore, A., Land, A.M., Leonard, B., Refsland, E.W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J.B., et al. (2013b). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 494, 366–370.

Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K., et al. (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.* 17, 2404–2411.

Casellas, R., Yamane, A., Kovalchuk, A.L., and Potter, M. (2009). Restricting activation-induced cytidine deaminase tumorigenic activity in B lymphocytes. *Immunology* 126, 316–328.

Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967–3975.

- Cavanagh, M.-H., Landry, S., Audet, B., Arpin-André, C., Hivin, P., Paré, M.-E., Thête, J., Wattel, E., Marriott, S.J., Mesnard, J.-M., et al. (2006). HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* 3, 15.
- Cereseto, A., Diella, F., Mulloy, J.C., Cara, A., Michieli, P., Grassmann, R., Franchini, G., and Klotman, M.E. (1996). p53 functional impairment and high p21waf1/cip1 expression in human T-cell lymphotropic/leukemia virus type I-transformed T cells. *Blood* 88, 1551–1560.
- Cerutti, A., Zan, H., Kim, E.C., Shah, S., Schattner, E.J., Schaffer, A., and Casali, P. (2002). Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 6594–6603.
- Chandhasin, C., Ducu, R.I., Berkovich, E., Kastan, M.B., and Marriott, S.J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *J. Virol.* 82, 6952–6961.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 541–552.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730.
- Chaudhuri, J., Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430, 992–998.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the Immunoglobulin Heavy Chain Class Switch Recombination Mechanism. In *Advances in Immunology*, Frederick W. Alt and Tasuku Honjo, ed. (Academic Press), pp. 157–214.
- Chen, R.-H., Shevchenko, A., Mann, M., and Murray, A.W. (1998). Spindle Checkpoint Protein Xmad1 Recruits Xmad2 to Unattached Kinetochores. *J. Cell Biol.* 143, 283–295.
- Cheng, G.Z., Zhang, W., and Wang, L.-H. (2008). Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res.* 68, 957–960.
- Chiba, T., Marusawa, H., Seno, H., and Watanabe, N. (2008). Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1175–1181.
- Chieco-Bianchi, L., Saggiaro, D., Del Mistro, A., Montaldo, A., Majone, F., and Levis, A.G. (1988). Chromosome damage induced in cord blood T-lymphocytes infected in vitro by HTLV-I. *Leukemia* 2, 223S – 232S.
- Ching, Y.-P., Chun, A.C.S., Chin, K.-T., Zhang, Z.-Q., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2004). Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology* 1, 18.
- Ching, Y.-P., Chan, S.-F., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat. Cell Biol.* 8, 717–724.

- Choi, I., Tanosaki, R., Uike, N., Utsunomiya, A., Tomonaga, M., Harada, M., Yamanaka, T., Kannagi, M., Okamura, J., and ATLL allo-HSCT Study Group (2011). Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. *Bone Marrow Transplant.* *46*, 116–118.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* *193*, 3–34.
- Chu, Z.L., DiDonato, J.A., Hawiger, J., and Ballard, D.W. (1998). The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *J. Biol. Chem.* *273*, 15891–15894.
- Clemens, K.E., Piras, G., Radonovich, M.F., Choi, K.S., Duvall, J.F., DeJong, J., Roeder, R., and Brady, J.N. (1996). Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4656–4664.
- Clerc, I., Polakowski, N., André-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and 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. *J. Biol. Chem.* *283*, 23903–23913.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., and Herbeuval, J.-P. (2010). Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *115*, 2177–2185.
- Conticello, S.G. (2008). The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* *9*, 229.
- Conticello, S.G., Thomas, C.J.F., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC Family of Polynucleotide (Deoxy)cytidine Deaminases. *Mol. Biol. Evol.* *22*, 367–377.
- Conticello, S.G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2008). Interaction between Antibody-Diversification Enzyme AID and Spliceosome-Associated Factor CTNNBL1. *Mol. Cell* *31*, 474–484.
- Cortizas, E.M., Zahn, A., Hajjar, M.E., Patenaude, A.-M., Di Noia, J.M., and Verdun, R.E. (2013). Alternative end-joining and classical nonhomologous end-joining pathways repair different types of double-strand breaks during class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 5751–5763.
- Crenon, I., Béraud, C., Simard, P., Montagne, J., Veschambre, P., and Jalinot, P. (1993). The transcriptionally active factors mediating the effect of the HTLV-I Tax transactivator on the IL-2R alpha kappa B enhancer include the product of the c-rel proto-oncogene. *Oncogene* *8*, 867–875.
- Crouch, E.E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montano, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F.N., et al. (2007). Regulation of AID expression in the immune response. *J. Exp. Med.* *204*, 1145–1156.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1840–1847.

- Danial, N.N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 7254–7263.
- Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NF κ B. *Int. Immunol.* *16*, 395–404.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007). DNA polymerase η is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* *204*, 17–23.
- Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Fan, S., Del Valle, L., Michiels, C., Sweet, T., Rom, I., Khalili, K., Rappaport, J., Amini, S., et al. (2009). Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1 α expression. *J. Biol. Chem.* *284*, 11364–11373.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID Mediates Hypermutation by Deaminating Single Stranded DNA. *J. Exp. Med.* *197*, 1291–1296.
- Doi, T., Kinoshita, K., Ikegawa, M., Muramatsu, M., and Honjo, T. (2003). De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 2634–2638.
- Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J., and Honjo, T. (2009). The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 2758–2763.
- Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.-H., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., San-Martin, B.R., Heidkamp, G., Schwickert, T.A., et al. (2008). MicroRNA-155 Suppresses Activation-Induced Cytidine Deaminase-Mediated Myc-Igh Translocation. *Immunity* *28*, 630–638.
- D’Souza, B.N., Edelstein, L.C., Pegman, P.M., Smith, S.M., Loughran, S.T., Clarke, A., Mehl, A., Rowe, M., Gélinas, C., and Walls, D. (2004). Nuclear Factor κ B-Dependent Activation of the Antiapoptotic bfl-1 Gene by the Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 and Activated CD40 Receptor. *J. Virol.* *78*, 1800–1816.
- Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* *416*, 1–8.
- Dunnick, W., Hertz, G.Z., Scappino, L., and Gritzmacher, C. (1993). DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* *21*, 365–372.
- Durandy, A., Peron, S., Taubenheim, N., and Fischer, A. (2006). Activation-induced cytidine deaminase: structure–function relationship as based on the study of mutants. *Hum. Mutat.* *27*, 1185–1191.
- Durkin, S.S., Guo, X., Fryrear, K.A., Mihaylova, V.T., Gupta, S.K., Belgnaoui, S.M., Haoudi, A., Kupfer, G.M., and Semmes, O.J. (2008). HTLV-1 Tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *283*, 36311–36320.
- Edelstein, L.C., Lagos, L., Simmons, M., Tirumalai, H., and Gélinas, C. (2003). NF-kappa B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2749–2761.

- Edwards, D.C., and Marriott, S.J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax relieves repression of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *J. Virol.* 82, 11714–11722.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.-M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* 26, 5587–5595.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kou, T., Nakase, H., Fujii, S., Fujimori, T., Kinoshita, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Activation-Induced Cytidine Deaminase Links Between Inflammation and the Development of Colitis-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 135, 889–898.e3.
- Erdman, S.E., and Poutahidis, T. (2010). Roles for Inflammation and Regulatory T Cells in Colon Cancer. *Toxicol. Pathol.* 38, 76–87.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Guéranger, Q., Zober, C., Léon, A., Bertocci, B., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2002). AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat. Immunol.* 3, 815–821.
- Fan, J., Ma, G., Nosaka, K., Tanabe, J., Satou, Y., Koito, A., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.-P., and Matsuoka, M. (2010). APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J. Virol.* 84, 7278–7287.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., and Kinzler, K.W. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49–56.
- Felber, B.K., Paskalis, H., Kleinman-Ewing, C., Wong-Staal, F., and Pavlakis, G.N. (1985). The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science* 229, 675–679.
- Feldhahn, N., Henke, N., Melchior, K., Duy, C., Soh, B.N., Klein, F., von Levetzow, G., Giebel, B., Li, A., Hofmann, W.-K., et al. (2007). Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* 204, 1157–1166.
- Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Chen, W., LaCasce, A.S., Cattoretti, G., Kurtin, P., Pinkus, G.S., Leval, L. de, Harris, N.L., et al. (2005). NF κ B activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 106, 1392–1399.
- Forconi, F., Sahota, S.S., Raspadori, D., Ippoliti, M., Babbage, G., Lauria, F., and Stevenson, F.K. (2004). Hairy cell leukemia: at the crossroad of somatic mutation and isotype switch. *Blood* 104, 3312–3317.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Fritz, E.L., Rosenberg, B.R., Lay, K., Mihailović, A., Tuschl, T., and Papavasiliou, F.N. (2013). A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* 14, 749–755.
- Fu, D.-X., Kuo, Y.-L., Liu, B.-Y., Jeang, K.-T., and Giam, C.-Z. (2003). Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 278,

1487–1493.

De la Fuente, C., Wang, L., Wang, D., Deng, L., Wu, K., Li, H., Stein, L.D., Denny, T., Coffman, F., Kehn, K., et al. (2003). Paradoxical effects of a stress signal on pro- and anti-apoptotic machinery in HTLV-1 Tax expressing cells. *Mol. Cell. Biochem.* **245**, 99–113.

Fujimoto, T., Hata, T., Itoyama, T., Nakamura, H., Tsukasaki, K., Yamada, Y., Ikeda, S., Sadamori, N., and Tomonaga, M. (1999). High rate of chromosomal abnormalities in HTLV-I-infected T-cell colonies derived from prodromal phase of adult T-cell leukemia: a study of IL-2-stimulated colony formation in methylcellulose. *Cancer Genet. Cytogenet.* **109**, 1–13.

Furukawa, Y., Kubota, R., Tara, M., Izumo, S., and Osame, M. (2001). Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* **97**, 987–993.

Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 1261–1270.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* **436**, 1186–1190.

Gatza, M.L., Watt, J.C., and Marriott, S.J. (2003). Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. *Oncogene* **22**, 5141–5149.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J. Virol.* **76**, 12813–12822.

Geisberger, R., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2009). The stability of AID and its function in class-switching are critically sensitive to the identity of its nuclear-export sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6736–6741.

Gelmez, M.Y., Teker, A.B.A., Aday, A.D., Yavuz, A.S., Soysal, T., Deniz, G., and Aktan, M. (2014). Analysis of activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in patients with chronic lymphocytic leukemia with different cytogenetic status. *Leuk. Lymphoma* **55**, 326–330.

Genschel, J., Bazemore, L.R., and Modrich, P. (2002). Human Exonuclease I Is Required for 5' and 3' Mismatch Repair. *J. Biol. Chem.* **277**, 13302–13311.

Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* **3**, 388.

Gessain, A., and Mahieux, R. (2012). Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev. Neurol. (Paris)* **168**, 257–269.

Golding, G.B., Gearhart, P.J., and Glickman, B.W. (1987). Patterns of Somatic Mutations in Immunoglobulin Variable Genes. *Genetics* **115**, 169–176.

Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention

of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 577–589.

Goncalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araujo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 577–589.

Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The Balance Between Pax5 and Id2 Activities Is the Key to AID Gene Expression. *J. Exp. Med.* **198**, 1427–1437.

Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* **31**, 167–177.

Gordon, M.S., Kanegai, C.M., Doerr, J.R., and Wall, R. (2003). Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Ig γ , CD79b) and mb1 (Ig γ , CD79a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4126–4131.

Gores, G.J. (2003). Cholangiocarcinoma: Current concepts and insights. *Hepatology* **37**, 961–969.

Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2006). A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* **24**, 779–786.

Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2007). Viral induction of AID is independent of the interferon and the Toll-like receptor signaling pathways but requires NF- κ B. *J. Exp. Med.* **204**, 259–265.

Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K.-T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**, 5976–5985.

Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., Castle, B.E., Janda, J., Marcu, K.B., and Parwaresch, R. (2003). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **101**, 3574–3580.

Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E., and Niedobitek, G. (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J. Pathol.* **205**, 541–547.

Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1057–1061.

Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S., and Masucci, M.G. (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2313–2318.

Guikema, J.E.J., Linehan, E.K., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., Strauss, P.R., Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2007). APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **204**, 3017–3026.

Guikema, J.E.J., Schrader, C.E., Brodsky, M.H., Linehan, E.K., Richards, A., El Falaky, N., Li, D.H., Sluss, H.K., Szomolanyi-Tsuda, E., and Stavnezer, J. (2010). p53 Represses Class Switch Recombination to IgG2a through its Antioxidant Function. *J.*

Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 6177–6187.

Gupta, S.K., Guo, X., Durkin, S.S., Fryrear, K.F., Ward, M.D., and Semmes, O.J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein prevents DNA damage-induced chromatin egress of hyperphosphorylated Chk2. *J. Biol. Chem.* *282*, 29431–29440.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* *400*, 464–468.

Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K.-T., and 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. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3327–3338.

Haller, K., Kibler, K.V., Kasai, T., Chi, Y.-H., Peloponese, J.-M., Yedavalli, V.S.R.K., and Jeang, K.-T. (2006). The N-terminus of rodent and human MAD1 confers species-specific stringency to spindle assembly checkpoint. *Oncogene* *25*, 2137–2147.

Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* *96*, 405–413.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* *371*, 257–261.

Hanon, E., Hall, S., Taylor, G.P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J.N., and Bangham, C.R. (2000). Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* *95*, 1386–1392.

Haoudi, A., Daniels, R.C., Wong, E., Kupfer, G., and Semmes, O.J. (2003). Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J. Biol. Chem.* *278*, 37736–37744.

Hardianti, M.S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Saigo, K., Kawano, S., Kumagai, S., Nakamura, F., and Matsuo, Y. (2004a). Expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in Burkitt lymphoma cells: rare AID-negative cell lines with the unmutated rearranged VH gene. *Leuk. Lymphoma* *45*, 155–160.

Hardianti, M.S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Saigo, K., Nakamachi, Y., Kumagai, S., Ohno, H., Tanabe, S., Uchida, M., et al. (2004b). Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: association between AID expression and ongoing mutation in FL. *Leukemia* *18*, 826–831.

Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 22911–22914.

Harhaj, E.W., Good, L., Xiao, G., and Sun, S.C. (1999). Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* *18*, 1341–1349.

Harris, R.S., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2002). RNA Editing Enzyme APOBEC1 and Some of Its Homologs Can Act as DNA Mutators. *Mol. Cell* *10*, 1247–1253.

Harrod, R., Kuo, Y.L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z.

(2000). p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J. Biol. Chem.* 275, 11852–11857.

Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., 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. *Nat. Med.* 12, 466–472.

Häsler, J., Rada, C., and Neuburger, M.S. (2012). The cytoplasmic AID complex. *Semin. Immunol.* 24, 273–280.

Hatta, Y., Hiramata, T., Miller, C.W., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Koeffler, H.P. (1995). Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood* 85, 2699–2704.

He, B., Qiao, X., and Cerutti, A. (2004). CpG DNA Induces IgG Class Switch DNA Recombination by Activating Human B Cells through an Innate Pathway That Requires TLR9 and Cooperates with IL-10. *J. Immunol.* 173, 4479–4491.

Heintel, D., Kroemer, E., Kienle, D., Schwarzing, I., Gleiss, A., Schwarzmeier, J., Marculescu, R., Le, T., Mannhalter, C., Gaiger, A., et al. (2004). High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGHV gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 18, 756–762.

Heiser, D., Labi, V., Erlacher, M., and Villunger, A. (2004). The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Exp. Gerontol.* 39, 1125–1135.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564.

Helmink, B.A., Tubbs, A.T., Dorsett, Y., Bednarski, J.J., Walker, L.M., Feng, Z., Sharma, G., McKinnon, P.J., Zhang, J., Bassing, C.H., et al. (2011). H2AX Prevents CtIP-Mediated DNA End Resection and Aberrant Repair in G1-Phase Lymphocytes. *Nature* 469, 245–249.

Hermine, O., Allard, I., Lévy, V., Arnulf, B., Gessain, A., Bazarbachi, A., and French ATL therapy group (2002). A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* 3, 276–282.

Himes, S.R., Coles, L.S., Katsikeros, R., Lang, R.K., and Shannon, M.F. (1993). HTLV-1 tax activation of the GM-CSF and G-CSF promoters requires the interaction of NF-kB with other transcription factor families. *Oncogene* 8, 3189–3197.

Hironaka, N., Mochida, K., Mori, N., Maeda, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2004). Tax-independent constitutive IkappaB kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia N. Y. N* 6, 266–278.

Honjo, T., and Kataoka, T. (1978). Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2140–2144.

Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. (2002). MOLECULAR MECHANISM OF CLASS SWITCH RECOMBINATION: Linkage with Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 165–196.

- Honjo, T., Nagaoka, H., Shinkura, R., and Muramatsu, M. (2005). AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat. Immunol.* 6, 655–661.
- Hoyos, B., Ballard, D.W., Böhnlein, E., Siekevitz, M., and Greene, W.C. (1989). Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 244, 457–460.
- Huong, L.T., Kobayashi, M., Nakata, M., Shioi, G., Miyachi, H., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2013). In Vivo Analysis of Aicda Gene Regulation: A Critical Balance between Upstream Enhancers and Intronic Silencers Governs Appropriate Expression. *PLoS ONE* 8.
- Hussain, S.P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W.P., Shields, P.G., Ham, A.J., Swenberg, J.A., Marrogi, A.J., et al. (2000). Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.* 60, 3333–3337.
- Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W., and Harris, C.C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26, 2166–2176.
- Iha, H., Kibler, K.V., Yedavalli, V.R.K., Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., Kasai, T., and Jeang, K.-T. (2003). Segregation of NF-kappaB activation through NEMO/IKKgamma by Tax and TNFalpha: implications for stimulus-specific interruption of oncogenic signaling. *Oncogene* 22, 8912–8923.
- Inoue, H., Yamaoka, S., Imamura, M., and Hatanaka, M. (1994). Suppression of the transformed phenotype in hybrids of human T-cell leukemia virus type I tax-transformed rat fibroblasts and normal human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 215, 68–74.
- Inoue, S., Matsumoto, T., Iida, M., Mizuno, M., Kuroki, F., Hoshika, K., and Shimizu, M. (1999). Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2441–2446.
- Ise, W., Kohyama, M., Schraml, B.U., Zhang, T., Schwer, B., Basu, U., Alt, F.W., Tang, J., Oltz, E.M., Murphy, T.L., et al. (2011). Batf controls the global regulators of class switch recombination in both B and T cells. *Nat. Immunol.* 12, 536–543.
- Ishida, T., Utsunomiya, A., Iida, S., Inagaki, H., Takatsuka, Y., Kusumoto, S., Takeuchi, G., Shimizu, S., Ito, M., Komatsu, H., et al. (2003). Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 3625–3634.
- Ishikawa, C., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M., and Mori, N. (2011). Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* 32, 110–119.
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1975–1980.
- Itoyama, T., Sadamori, N., Tokunaga, S., Sasagawa, I., Nakamura, H., Yao, E., Jubashi, T., Yamada, Y., Ikeda, S., and Ichimaru, M. (1990). Cytogenetic studies of human T-cell leukemia virus type I carriers. A family study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 49, 157–163.

- Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T., and Nakamura, M. (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 20, 2055–2067.
- Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M.A., Okamura, N., Huang, Y., and Ohtani, K. (2008). Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* 27, 5635–5642.
- Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T., and Yamagishi, H. (1990). Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 62, 143–149.
- Jeang, K.T. (2001). Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 207–217.
- Jeang, K.T., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M., and Khoury, G. (1988). Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J. Virol.* 62, 4499–4509.
- Jeang, K.T., Widen, S.G., Semmes, O.J., and Wilson, S.H. (1990). HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* 247, 1082–1084.
- Jiang, H., Lu, H., Schiltz, R.L., Pise-Masison, C.A., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., and Brady, J.N. (1999). PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8136–8145.
- Jin, D.Y., Spencer, F., and Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* 93, 81–91.
- Jin, D.Y., Giordano, V., Kibler, K.V., Nakano, H., and Jeang, K.T. (1999). Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J. Biol. Chem.* 274, 17402–17405.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* 14, 429–436.
- Journé, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., et al. (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* 5, e1000521.
- Kamada, N., Sakurai, M., Miyamoto, K., Sanada, I., Sadamori, N., Fukuhara, S., Abe, S., Shiraishi, Y., Abe, T., and Kaneko, Y. (1992). Chromosome abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma: a karyotype review committee report. *Cancer Res.* 52, 1481–1493.
- Kannagi, M., Hasegawa, A., Kinpara, S., Shimizu, Y., Takamori, A., and Utsunomiya, A. (2011). Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 by innate and acquired immunity. *Cancer Sci.* 102, 670–676.
- Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 73, 4299–4304.

- Kao, S.-Y., Lemoine, F.J., and Marriott, S.J. (2000). Suppression of DNA Repair by Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Rescued by a Functional p53 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 35926–35931.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.-W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301–310.
- Karpurapu, M., Ranjan, R., Deng, J., Chung, S., Lee, Y.G., Xiao, L., Nirujogi, T.S., Jacobson, J.R., Park, G.Y., and Christman, J.W. (2014). Kr?ppel Like Factor 4 Promoter Undergoes Active Demethylation during Monocyte/Macrophage Differentiation. *PLoS ONE* 9.
- Kasai, T., Iwanaga, Y., Iha, H., and Jeang, K.-T. (2002). Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J. Biol. Chem.* 277, 5187–5193.
- Kashanchi, F., and Brady, J.N. (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* 24, 5938–5951.
- Keates, S., Hitti, Y.S., Upton, M., and Kelly, C.P. (1997). Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1099–1109.
- Kern, S.E., Redston, M., Seymour, A.B., Caldas, C., Powell, S.M., Kornacki, S., and Kinzler, K.W. (1994). Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* 107, 420–428.
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Bert, M.L., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S μ tandem repeat. *Blood* 103, 3828–3836.
- Kikuchi-Yanoshita, R., Konishi, M., Fukunari, H., Tanaka, K., and Miyaki, M. (1992a). Loss of expression of the DCC gene during progression of colorectal carcinomas in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 52, 3801–3803.
- Kikuchi-Yanoshita, R., Konishi, M., Ito, S., Seki, M., Tanaka, K., Maeda, Y., Iino, H., Fukayama, M., Koike, M., and Mori, T. (1992b). Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 52, 3965–3971.
- Kim, Y.-M., Geiger, T.R., Egan, D.I., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 29, 2142–2152.
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2010). Induction of Reactive Oxygen Species by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Correlates with DNA Damage and Expression of Cellular Senescence Marker. *J. Virol.* 84, 5431–5437.
- Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M., and Honjo, T. (2001). A hallmark of active class switch recombination: Transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12620–12623.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87, 159–170.

- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., et al. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* 194, 1625–1638.
- Klemm, L., Duy, C., Iacobucci, I., Kuchen, S., von Levetzow, G., Feldhahn, N., Henke, N., Li, Z., Hoffmann, T.K., Kim, Y., et al. (2009). The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 16, 232–245.
- Kobayashi, M., Aida, M., Nagaoka, H., Begum, N.A., Kitawaki, Y., Nakata, M., Stanlie, A., Doi, T., Kato, L., Okazaki, I., et al. (2009). AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 22375–22380.
- Kohno, T., Yamada, Y., Akamatsu, N., Kamihira, S., Imaizumi, Y., Tomonaga, M., and Matsuyama, T. (2005). Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer Sci.* 96, 527–533.
- Komori, J., Marusawa, H., Machimoto, T., Endo, Y., Kinoshita, K., Kou, T., Haga, H., Ikai, I., Uemoto, S., and Chiba, T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* 47, 888–896.
- Kotani, A., Okazaki, I., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Begum, N.A., Nakajima, T., Saito, H., and Honjo, T. (2005). A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4506–4511.
- Kou, T., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Okazaki, I.-M., Ueda, Y., Kodama, Y., Haga, H., Ikai, I., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 469–476.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681–710.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 251–262.
- Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580–5594.
- Labet, V., Grand, A., Cadet, J., and Eriksson, L.A. (2008). Deamination of the radical cation of the base moiety of 2'-deoxycytidine: a theoretical study. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 9, 1195–1203.
- De La Fuente, C., Santiago, F., Chong, S.Y., Deng, L., Mayhood, T., Fu, P., Stein, D., Denny, T., Coffman, F., Azimi, N., et al. (2000). Overexpression of p21(waf1) in human T-cell lymphotropic virus type 1-infected cells and its association with cyclin A/cdk2. *J. Virol.* 74, 7270–7283.
- Lam, T., Thomas, L.M., White, C.A., Li, G., Pone, E.J., Xu, Z., and Casali, P. (2013). Scaffold Functions of 14-3-3 Adaptors in B Cell Immunoglobulin Class Switch DNA Recombination. *PLoS ONE* 8.
- Lebecque, S.G., and Gearhart, P.J. (1990). Boundaries of somatic mutation in

- rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J. Exp. Med.* **172**, 1717–1727.
- Lemoine, F.J., Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (2000). Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 1623–1627.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183–192.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15–20.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–673.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–734.
- Lin, W.-W., and Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175–1183.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008a). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* **451**, 841–845.
- Liu, M., Yang, L., Zhang, L., Liu, B., Merling, R., Xia, Z., and Giam, C.-Z. (2008b). Human T-cell leukemia virus type 1 infection leads to arrest in the G1 phase of the cell cycle. *J. Virol.* **82**, 8442–8455.
- Lo, J.C., Basak, S., James, E.S., Quiambo, R.S., Kinsella, M.C., Alegre, M.-L., Weih, F., Franzoso, G., Hoffmann, A., and Fu, Y.-X. (2006). Coordination between NF- κ B family members p50 and p52 is essential for mediating LT β R signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood* **107**, 1048–1055.
- Longerich, S., Tanaka, A., Bozek, G., Nicolae, D., and Storb, U. (2005). The very 5' end and the constant region of Ig genes are spared from somatic mutation because AID does not access these regions. *J. Exp. Med.* **202**, 1443–1454.
- Longerich, S., Basu, U., Alt, F., and Storb, U. (2006). AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 164–174.
- Los, M., Khazaie, K., Schulze-Osthoff, K., Baeuerle, P.A., Schirmacher, V., and Chlichlia, K. (1998). Human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) Tax-mediated apoptosis in activated T cells requires an enhanced intracellular prooxidant state. *J. Immunol. Baltim. Md* **161**, 3050–3055.
- Low, K.G., Dorner, L.F., Fernando, D.B., Grossman, J., Jeang, K.T., and Comb, M.J. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax releases cell cycle arrest induced by p16INK4a. *J. Virol.* **71**, 1956–1962.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Fletcher, T.M., Schiltz, R.L., Nagaich, A.K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P.A., and Brady, J.N. (2002). Acetylation of Nucleosomal Histones by p300 Facilitates Transcription from Tax-Responsive Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Chromatin Template. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4450–4462.
- Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Selsing, E. (2001). The μ Switch

Region Tandem Repeats Are Important, but Not Required, for Antibody Class Switch Recombination. *J. Exp. Med.* 193, 159–168.

Machida, K., Cheng, K.T.-H., Lai, C.-K., Jeng, K.-S., Sung, V.M.-H., and Lai, M.M.C. (2006). Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J. Virol.* 80, 7199–7207.

Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2207–2217.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.

Majone, F., and Jeang, K.T. (2000). Clastogenic effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein correlates with unstabilized DNA breaks. *J. Biol. Chem.* 275, 32906–32910.

Manis, J.P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., and Alt, F.W. (1998). Ku70 Is Required for Late B Cell Development and Immunoglobulin Heavy Chain Class Switching. *J. Exp. Med.* 187, 2081–2089.

Manis, J.P., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23, 31–39.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.

Mariner, J.M., Lantz, V., Waldmann, T.A., and Azimi, N. (2001). Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 166, 2602–2609.

Marriott, S.J., and Semmes, O.J. (2005). Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 24, 5986–5995.

Martin, A., and Scharff, M.D. (2002). AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 605–614.

Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J. Virol.* 73, 4713–4720.

Marusawa, H., Takai, A., and Chiba, T. (2011). Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Adv. Immunol.* 111, 109–141.

Maruyama, K., Fukushima, T., Kawamura, K., and Mochizuki, S. (1990). Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res.* 50, 5697S – 5702S.

Mathieu, A.-L., Sperandio, O., Pottiez, V., Balzarín, S., Herlédan, A., Elkaïm, J.O., Fogeron, M.-L., Piveteau, C., Dassonneville, S., Deprez, B., et al. (2014). Identification of Small Inhibitory Molecules Targeting the Bcl-1 Anti-Apoptotic Protein That Alleviates Resistance to ABT-737. *J. Biomol. Screen.* 19, 1035–1046.

Matsumoto, K., Shibata, H., Fujisawa, J.I., Inoue, H., Hakura, A., Tsukahara, T., and

- Fujii, M. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J. Virol.* **71**, 4445–4451.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.-M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.* **13**, 470–476.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Niwa, Y., Sakai, Y., and Chiba, T. (2010). Up-regulation of Activation-Induced Cytidine Deaminase Causes Genetic Aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in Gastric Cancer. *Gastroenterology* **139**, 1984–1994.
- Matsuoka, M. (2010). [Mechanism of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1]. *Gan To Kagaku Ryoho* **37**, 10–13.
- Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S., and Sakano, H. (1990). Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: Evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* **62**, 135–142.
- Matutes, E. (2007). Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1373–1377.
- Matutes, E., Taylor, G.P., Cavenagh, J., Pagliuca, A., Bareford, D., Domingo, A., Hamblin, M., Kelsey, S., Mir, N., and Reilly, J.T. (2001). Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. *Br. J. Haematol.* **113**, 779–784.
- Maul, R.W., Saribasak, H., Martomo, S.A., McClure, R.L., Yang, W., Vaisman, A., Gramlich, H.S., Schatz, D.G., Woodgate, R., Iii, D.M.W., et al. (2011). Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat. Immunol.* **12**, 70–76.
- McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., and Nussenzweig, M.C. (2004). Somatic Hypermutation Is Limited by CRM1-dependent Nuclear Export of Activation-induced Deaminase. *J. Exp. Med.* **199**, 1235–1244.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2006). Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8798–8803.
- Migliazza, A., Martinotti, S., Chen, W., Fusco, C., Ye, B.H., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12520–12524.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49–55.
- Min, I.M., Rothlein, L.R., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Selsing, E. (2005). Shifts in targeting of class switch recombination sites in mice that lack μ switch region tandem repeats or Msh2. *J. Exp. Med.* **201**, 1885–1890.
- Miyake, H., Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1999). Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* **253**, 155–161.
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M., and Nakamura, M. (2009).

Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J. Biol. Chem.* 284, 25501–25511.

Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R., Morrone, G., Marasco, O., Luzzi, F., and Pallone, F. (1997). Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112, 1169–1178.

Morales, A.A., Olsson, A., Celsing, F., Österborg, A., Jondal, M., and Osorio, L.M. (2005). High expression of Bcl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer* 113, 730–737.

Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. (2004). Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues IMPLICATIONS FOR EPIGENETIC REPROGRAMMING. *J. Biol. Chem.* 279, 52353–52360.

Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D.W., and Yamamoto, N. (1999). Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93, 2360–2368.

Morisawa, T., Marusawa, H., Ueda, Y., Iwai, A., Okazaki, I., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int. J. Cancer* 123, 2735–2740.

Mottok, A., Hansmann, M.-L., and Brauninger, A. (2005). Activation induced cytidine deaminase expression in lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 58, 1002–1004.

Murakami, T., Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., and Yoshida, M. (1995). HTLV-1 Tax enhances NF-kappa B2 expression and binds to the products p52 and p100, but does not suppress the inhibitory function of p100. *Virology* 206, 1066–1074.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* 102, 553–563.

Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N.A., and Honjo, T. (2007). Discovery of Activation-Induced Cytidine Deaminase, the Engraver of Antibody Memory. In *Advances in Immunology*, Frederick W. Alt and Tasuku Honjo, ed. (Academic Press), pp. 1–36.

Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000). Somatic Mutation of the Cd95 Gene in Human B Cells as a Side-Effect of the Germinal Center Reaction. *J. Exp. Med.* 192, 1833–1840.

Mussil, B., Suspene, R., Aynaud, M.-M., Gauvrit, A., Vartanian, J.-P., and Wain-Hobson, S. (2013). Human APOBEC3A Isoforms Translocate to the Nucleus and Induce DNA Double Strand Breaks Leading to Cell Stress and Death. *PLoS ONE* 8.

Muto, T., Okazaki, I., Yamada, S., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2006). Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2752–2757.

- Nabel, C.S., Lee, J.W., Wang, L.C., and Kohli, R.M. (2013). Nucleic acid determinants for selective deamination of DNA over RNA by activation-induced deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14225–14230.
- Nakai-Murakami, C., Minemoto, Y., and Ishizaka, Y. (2009). Vpr-induced DNA double-strand breaks: molecular mechanism and biological relevance. *Curr. HIV Res.* *7*, 109–113.
- Nakamura, M., Kondo, S., Sugai, M., Nazarea, M., Imamura, S., and Honjo, T. (1996). High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int. Immunol.* *8*, 193–201.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Arao, T., Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A.-K., Yamada, Y., Fujii, M., Oiso, N., Kawada, A., et al. (2008). Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene* *27*, 3221–3232.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137–2140.
- Naumann, M. (2001). Host cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *291*, 299–305.
- Neuberger, M.S., Di Noia, J.M., Beale, R.C.L., Williams, G.T., Yang, Z., and Rada, C. (2005). Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 171–178.
- Neuveut, C., and Jeang, K.-T. (2002). Cell cycle dysregulation by HTLV-I: role of the tax oncoprotein. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *7*, d157–d163.
- Neuveut, C., Low, K.G., Maldarelli, F., Schmitt, I., Majone, F., Grassmann, R., and Jeang, K.T. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3620–3632.
- Ng, P.W., Iha, H., Iwanaga, Y., Bittner, M., Chen, Y., Jiang, Y., Gooden, G., Trent, J.M., Meltzer, P., Jeang, K.T., 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.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* *268*, 25265–25268.
- Nitta, T., Kanai, M., Sugihara, E., Tanaka, M., Sun, B., Nagasawa, T., Sonoda, S., Saya, H., and Miwa, M. (2006). Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells. *Cancer Sci.* *97*, 836–841.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* *12*, 160–166.
- Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). A Backup DNA Repair Pathway Moves to the Forefront. *Cell* *131*, 223–225.

- Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S., and Urano, T. (2007). The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nat. Med.* *13*, 527–528.
- Ohtani, K., Iwanaga, R., Arai, M., Huang, Y., Matsumura, Y., and Nakamura, M. (2000). Cell type-specific E2F activation and cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *J. Biol. Chem.* *275*, 11154–11163.
- Okada, M., and Jeang, K.-T. (2002). Differential requirements for activation of integrated and transiently transfected human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* *76*, 12564–12573.
- Okazaki, I., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2003). Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis. *J. Exp. Med.* *197*, 1173–1181.
- Okazaki, I., Okawa, K., Kobayashi, M., Yoshikawa, K., Kawamoto, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Kitawaki, Y., Taniguchi, H., Natsume, T., et al. (2011). Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7920–7925.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.
- Olsson, A., Norberg, M., Okvist, A., Derkow, K., Choudhury, A., Tobin, G., Celsing, F., Osterborg, A., Rosenquist, R., Jondal, M., et al. (2007). Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer* *97*, 769–777.
- Oppezzo, P., Vuillier, F., Vasconcelos, Y., Dumas, G., Magnac, C., Payelle-Brogard, B., Pritsch, O., and Dighiero, G. (2003). Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* *101*, 4029–4032.
- Orland, J.R., Engstrom, J., Frider, J., Sacher, R.A., Smith, J.W., Nass, C., Garratty, G., Newman, B., Smith, D., Wang, B., et al. (2003). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* *61*, 1588–1594.
- Orthwein, A., Patenaude, A.-M., Affar, E.B., Lamarre, A., Young, J.C., and Di Noia, J.M. (2010). Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J. Exp. Med.* *207*, 2751–2765.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853–6866.
- Palacios, F., Moreno, P., Morande, P., Abreu, C., Correa, A., Porro, V., Landoni, A.I., Gabus, R., Giordano, M., Dighiero, G., et al. (2010). High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* *115*, 4488–4496.
- Papavasiliou, F.N., and Schatz, D.G. (2002). Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes. *Cell* *109*, S35–S44.
- Park, H.U., Jeong, J.-H., Chung, J.H., and Brady, J.N. (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.

- Park, H.U., Jeong, S.-J., Jeong, J.-H., Chung, J.H., and Brady, J.N. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax attenuates gamma-irradiation-induced apoptosis through physical interaction with Chk2. *Oncogene* 25, 438–447.
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146.
- Park, S.-R., Zan, H., Pal, Z., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E.J., Xu, Z., Mai, T., and Casali, P. (2009). HoxC4 binds to the Aicda promoter to induce AID expression, class switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat. Immunol.* 10, 540–550.
- Park, S.-R., Kim, P.-H., Lee, K.-S., Lee, S.-H., Seo, G.-Y., Yoo, Y.-C., Lee, J., and Casali, P. (2013). APRIL stimulates NF- κ B-mediated HoxC4 induction for AID expression in mouse B cells. *Cytokine* 61, 608–613.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 823–832.
- Parsa, J.-Y., Basit, W., Wang, C.L., Gommerman, J.L., Carlyle, J.R., and Martin, A. (2007). AID mutates a non-immunoglobulin transgene independent of chromosomal position. *Mol. Immunol.* 44, 567–575.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S.K., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., et al. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11816–11821.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341–346.
- Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (2004). Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* 104, 3318–3325.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* 40, 108–112.
- Patel, T. (2006). Cholangiocarcinoma. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 33–42.
- Patenaude, A.-M., Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V.A., Kavli, B., Buschiazzi, A., and Di Noia, J.M. (2009). Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 517–527.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., San-Martin, B.R., Barreto, V., et al. (2010). Activation-Induced Cytidine Deaminase Targets DNA at Sites of RNA Polymerase II Stalling by Interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133.
- Pegman, P.M., Smith, S.M., D'Souza, B.N., Loughran, S.T., Maier, S., Kempkes, B.,

- Cahill, P.A., Simmons, M.J., Gélinas, C., and Walls, D. (2006). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 trans-Activates the Cellular Antiapoptotic bfl-1 Gene by a CBF1/RBPJ κ -Dependent Pathway. *J. Virol.* 80, 8133–8144.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The Biochemistry of Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 481–511.
- Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2006). Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 281, 8927–8938.
- Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., and Jeang, K.-T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18974–18979.
- Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2003). In Vitro Deamination of Cytosine to Uracil in Single-stranded DNA by Apolipoprotein B Editing Complex Catalytic Subunit 1 (APOBEC1). *J. Biol. Chem.* 278, 19583–19586.
- Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99–104.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103–107.
- Philpott, S.M., and Buehring, G.C. (1999). Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 933–942.
- Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Mahieux, R., Chatterjee, P., Whiteford, C., Duvall, J., Guillermin, C., Gessain, A., and Brady, J.N. (2002). Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res.* 62, 3562–3571.
- Podolsky, D.K. (2002). The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16, 933–943.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., and Gallo, R.C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268–271.
- Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., et al. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* 3, 767.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by Aid deficiency. *Nature* 463, 1101–1105.
- Portis, T., Harding, J.C., and 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., and Jay, G. (1990). The human T-lymphotropic virus type I tax

gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 413–417.

Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Soares, B.C., and Murphy, E.L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058–6068.

Pumfery, A., de la Fuente, C., and Kashanchi, F. (2006). HTLV-1 Tax: centrosome amplification and cancer. *Retrovirology* 3, 50.

Rada, C., Yélamos, J., Dean, W., and Milstein, C. (1997). The 5′ hypermutation boundary of x chains is independent of local and neighbouring sequences and related to the distance from the initiation of transcription. *Eur. J. Immunol.* 27, 3115–3120.

Rada, C., Jarvis, J.M., and Milstein, C. (2002a). AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7003–7008.

Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002b). Immunoglobulin Isotype Switching Is Inhibited and Somatic Hypermutation Perturbed in UNG-Deficient Mice. *Curr. Biol.* 12, 1748–1755.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. *Cell* 135, 1201–1212.

Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758.

Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat. Immunol.* 4, 452–456.

Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo. *Cell* 118, 431–438.

Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., et al. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440, 105–109.

Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781–790.

Rebhandl, S., Huemer, M., Gassner, F.J., Zaborsky, N., Hebenstreit, D., Catakovic, K., Grössinger, E.M., Greil, R., and Geisberger, R. (2014). APOBEC3 signature mutations in chronic lymphocytic. *Leukemia* 28, 1929–1932.

Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225–3236.

Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089–1093.

Reiniger, L., Bödör, C., Bognár, A., Balogh, Z., Csomor, J., Szepesi, A., Kopper, L., and Matolcsy, A. (2006). Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. *Leukemia* 20, 1089–1095.

- Ressler, S., Morris, G.F., and Marriott, S.J. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *J. Virol.* **71**, 1181–1190.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565–575.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID Is Required for the Chromosomal Breaks in c-myc that Lead to c-myc/IgH Translocations. *Cell* **135**, 1028–1038.
- Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., et al. (2009). AID Produces DNA Double-Strand Breaks in Non-Ig Genes and Mature B Cell Lymphomas with Reciprocal Chromosome Translocations. *Mol. Cell* **36**, 631–641.
- Robek, M.D., and 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. *J. Virol.* **73**, 4856–4865.
- Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., et al. (2013). An APOBEC Cytidine Deaminase Mutagenesis Pattern is Widespread in Human Cancers. *Nat. Genet.* **45**, 970–976.
- Rogozin, I.B., and Diaz, M. (2004). Cutting Edge: DGYW/WRCH Is a Better Predictor of Mutability at G:C Bases in Ig Hypermutation Than the Widely Accepted RGYW/WRCY Motif and Probably Reflects a Two-Step Activation-Induced Cytidine Deaminase-Triggered Process. *J. Immunol.* **172**, 3382–3384.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., et al. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**, 1639–1647.
- Rossi, D., Berra, E., Cerri, M., Deambrogi, C., Barbieri, C., Franceschetti, S., Lunghi, M., Conconi, A., Paulli, M., Matolcsy, A., et al. (2006). Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **91**, 1405–1409.
- Ruben, S., Poteat, H., Tan, T.H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W., and Rosen, C.A. (1988). Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* **241**, 89–92.
- Rucci, F., Cattaneo, L., Marrella, V., Sacco, M.G., Sobacchi, C., Lucchini, F., Nicola, S., Bella, S.D., Villa, M.L., Imberti, L., et al. (2006). Tissue-specific sensitivity to AID expression in transgenic mouse models. *Gene* **377**, 150–158.
- Sabouri, S., Kobayashi, M., Begum, N.A., Xu, J., Hirota, K., and Honjo, T. (2014). C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for efficient class switch recombination and gene conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2253–2258.
- Sadamori, N. (1991). Cytogenetic implication in adult T-cell leukemia. A hypothesis of leukemogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* **51**, 131–136.

- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N., and Kashanchi, F. (1999). Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* **73**, 9917–9927.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 720–725.
- Sawyer, S.L., Emerman, M., and Malik, H.S. (2004). Ancient Adaptive Evolution of the Primate Antiviral DNA-Editing Enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* **2**, e275.
- Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., and Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 586–593.
- Schavinsky-Khrapunsky, Y., Priel, E., and Aboud, M. (2008). Dose-dependent dual effect of HTLV-1 tax oncoprotein on p53-dependent nucleotide excision repair in human T-cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **122**, 305–316.
- Schitteck, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., and Garbe, C. (2007). The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **120**, 2110–2118.
- Schmitt, I., Rosin, O., Rohwer, P., Gossen, M., and Grassmann, R. (1998). Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* **72**, 633–640.
- Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mochegova, S.N., Woodland, R.T., and Stavnezer, J. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* **202**, 561–568.
- Schrader, C.E., Guikema, J.E.J., Linehan, E.K., Selsing, E., and Stavnezer, J. (2007). Activation-Induced Cytidine Deaminase-Dependent DNA Breaks in Class Switch Recombination Occur during G1 Phase of the Cell Cycle and Depend upon Mismatch Repair. *J. Immunol.* **179**, 6064–6071.
- Schroeder, H.W., and Dighiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today* **15**, 288–294.
- Schwedler, U. von, Jck, H.-M., and Wabl, M. (1990). Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Publ. Online* 31 May 1990 Doi101038345452a0 **345**, 452–456.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **25**, 225–236.
- Shaffer, A.L., Lin, K.-I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltner, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity* **17**, 51–62.
- Shembade, N. (2010). Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF- κ B activation. *World J. Biol. Chem.* **1**, 13.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., and Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6

gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750–1752.

Shen, H.M., Ratnam, S., and Storb, U. (2005). Targeting of the Activation-Induced Cytosine Deaminase Is Strongly Influenced by the Sequence and Structure of the Targeted DNA. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10815–10821.

Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., and Collins, T. (1999). Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6367–6378.

Shim, Y.H., Byun, E.K., Lee, M.J., Huh, J., and Kim, C.W. (2000). Anti-apoptotic role of Bfl-1 in staurosporine-treated B-lymphoblastic cells. *Int. J. Hematol.* 72, 484–490.

Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984–87). *Br. J. Haematol.* 79, 428–437.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.

Shinkura, R., Ito, S., Begum, N.A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., and Honjo, T. (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 707–712.

Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Naito, S., and Kohno, K. (2008). Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* 27, 5543–5553.

Shiotani, A., Cen, P., and Graham, D.Y. (2013). Eradication of gastric cancer is now both possible and practical. *Semin. Cancer Biol.* 23, 492–501.

Silic-Benussi, M., Cavallari, I., Zorzan, T., Rossi, E., Hiraragi, H., Rosato, A., Horie, K., Saggiaro, D., Lairmore, M.D., Willems, L., et al. (2004). Suppression of tumor growth and cell proliferation by p13II, a mitochondrial protein of human T cell leukemia virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6629–6634.

Simmons, M.J., Fan, G., Zong, W.-X., Degenhardt, K., White, E., and Gélinas, C. (2008). Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27, 1421–1428.

Smit, L.A., Bende, R.J., Aten, J., Guikema, J.E.J., Aarts, W.M., and Noesel, C.J.M. van (2003). Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase Is Confined to B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas of Germinal-Center Phenotype. *Cancer Res.* 63, 3894–3898.

Smith, D.S., Creadon, G., Jena, P.K., Portanova, J.P., Kotzin, B.L., and Wysocki, L.J. (1996). Di- and trinucleotide target preferences of somatic mutagenesis in normal and autoreactive B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 2642–2652.

Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., and Wolf, C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9433–9438.

Snider, M.J., Reinhardt, L., Wolfenden, R., and Cleland, W.W. (2002). ¹⁵N kinetic

isotope effects on uncatalyzed and enzymatic deamination of cytidine. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 415–421.

Sohail, A., Klapacz, J., Samaranayake, M., Ullah, A., and Bhagwat, A.S. (2003). Human activation - induced cytidine deaminase causes transcription - dependent, strand - biased C to U deaminations. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2990–2994.

Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Olivier-Martin, C., Goujet-Zalc, C., Charneau, P., and de Villartay, J.-P. (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **204**, 1717–1727.

Stasinopoulos, I.A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, P., and Raman, V. (2005). HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 2294–2299.

Stavnezer, J. (1996). Antibody class switching. *Adv. Immunol.* **61**, 79–146.

Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2006). Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet.* **22**, 23–28.

Sun, S.-C., and Yamaoka, S. (2005). Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* **24**, 5952–5964.

Surani, M.A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414**, 122–128.

Suspene, R., Aynaud, M.-M., Guetard, D., Henry, M., Eckhoff, G., Marchio, A., Pineau, P., Dejean, A., Vartanian, J.-P., and Wain-Hobson, S. (2011). Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4858–4863.

Suzuki, T., Hirai, H., Fujisawa, J., Fujita, T., and Yoshida, M. (1993). A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CArG box. *Oncogene* **8**, 2391–2397.

Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* **9**, 3099–3105.

Suzuki, T., Kitao, S., Matsushime, H., and Yoshida, M. (1996). HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J.* **15**, 1607–1614.

Suzuki, T., Narita, T., Uchida-Toita, M., and Yoshida, M. (1999). Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms. *Virology* **259**, 384–391.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872.

- Takai, A., Toyoshima, T., Uemura, M., Kitawaki, Y., Marusawa, H., Hiai, H., Yamada, S., Okazaki, I.M., Honjo, T., Chiba, T., et al. (2009). A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* 28, 469–478.
- Takai, A., Marusawa, H., and Chiba, T. (2011). Acquisition of Genetic Aberrations by Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) during Inflammation-Associated Carcinogenesis. *Cancers* 3, 2750–2766.
- Takai, A., Marusawa, H., Minaki, Y., Watanabe, T., Nakase, H., Kinoshita, K., Tsujimoto, G., and Chiba, T. (2012). Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation. *Oncogene* 31, 1733–1742.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 109, 559–567.
- Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88, 3065–3073.
- Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1071–1075.
- Taniai, M., Higuchi, H., Burgart, L.J., and Gores, G.J. (2002). p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 123, 1090–1098.
- Tanji, H., Ishikawa, C., Sawada, S., Nakachi, S., Takamatsu, R., Matsuda, T., Okudaira, T., Uchihara, J.-N., Ohshiro, K., Tanaka, Y., et al. (2010). Aberrant expression of the transcription factor Twist in adult T-cell leukemia. *Blood*.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). microRNA-155 is a negative regulator of Activation Induced Cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621–629.
- Thébault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 562, 165–170.
- De Thé, G., and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 381–386.
- Tippin, B., and Goodman, M.F. (2001). A new class of errant DNA polymerases provides candidates for somatic hypermutation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356, 47–51.
- Tomita, M., Tanaka, Y., and Mori, N. (2012). MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130, 2300–2309.
- Tran, T.H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N.A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2010). B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nat. Immunol.* 11, 148–154.
- Tripp, A., Banerjee, P., Sieburg, M., Planelles, V., Li, F., and Feuer, G. (2005). Induction of cell cycle arrest by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax in

hematopoietic progenitor (CD34+) cells: modulation of p21cip1/waf1 and p27kip1 expression. *J. Virol.* 79, 14069–14078.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.

Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J.C., Harrington, W., O'Mahony, D., Janik, J.E., Bittencourt, A.L., Taylor, G.P., et al. (2009). Definition, Prognostic Factors, Treatment, and Response Criteria of Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Proposal From an International Consensus Meeting. *J. Clin. Oncol.* 27, 453–459.

Uchimura, Y., Barton, L.F., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2011). REG- γ associates with and modulates the abundance of nuclear activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* 208, 2385–2391.

Ueda, M., Imada, K., Imura, A., Koga, H., Hishizawa, M., and Uchiyama, T. (2005). Expression of functional interleukin-21 receptor on adult T-cell leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 128, 169–176.

Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A.T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 424–430.

Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625–630.

Vendel, A.C., McBryant, S.J., and Lumb, K.J. (2003). KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 12481–12487.

Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., and Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect. Dis.* 7, 266–281.

Vernon, A.E., and LaBonne, C. (2004). Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr. Biol.* CB 14, R719–R721.

Villaudy, J., Wencker, M., Gadot, N., Gillet, N.A., Scoazec, J.-Y., Gazzolo, L., Manz, M.G., Bangham, C.R.M., and Dodon, M.D. (2011). HTLV-1 propels thymic human T cell development in “human immune system” Rag2^{-/-} gamma c^{-/-} mice. *PLoS Pathog.* 7, e1002231.

Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S., and Chaudhuri, J. (2009). Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 10, 420–426.

Vuong, B.Q., Herrick-Reynolds, K., Vaidyanathan, B., Pucella, J.N., Ucher, A.J., Donghia, N.M., Gu, X., Nicolas, L., Nowak, U., Rahman, N., et al. (2013). A DNA break- and phosphorylation-dependent positive feedback loop promotes immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 14, 1183–1189.

Wang, C.L., Harper, R.A., and Wabl, M. (2004). Genome-wide somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7352–7356.

- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, 6170–6182.
- Watanapa, P., and Watanapa, W.B. (2002). Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br. J. Surg.* 89, 962–970.
- Weigert, M.G., Cesari, I.M., Yonkovich, S.J., and Cohn, M. (1970). Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228, 1045–1047.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.
- Whang-Peng, J., Bunn, P.A., Knutsen, T., Kao-Shan, C.S., Broder, S., Jaffe, E.S., Gelmann, E., Blattner, W., Lofters, W., and Young, R.C. (1985). Cytogenetic studies in human T-cell lymphoma virus (HTLV)-positive leukemia-lymphoma in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 74, 357–369.
- Wilson, T.M., Vaisman, A., Martomo, S.A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., and Gearhart, P.J. (2005). MSH2–MSH6 stimulates DNA polymerase η , suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J. Exp. Med.* 201, 637–645.
- Wong, C., and Stearns, T. (2003). Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat. Cell Biol.* 5, 539–544.
- Xia, L., Wurmbach, E., Waxman, S., and Jing, Y. (2006). Upregulation of Bfl-1/A1 in leukemia cells undergoing differentiation by all-trans retinoic acid treatment attenuates chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Leukemia* 20, 1009–1016.
- Xu, W., Santini, P.A., Matthews, A.J., Chiu, A., Plebani, A., He, B., Chen, K., and Cerutti, A. (2008). Viral Double-Stranded RNA Triggers Ig Class Switching by Activating Upper Respiratory Mucosa B Cells through an Innate TLR3 Pathway Involving BAFF. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 276–287.
- Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L.M., Al-Qahtani, A., White, C.A., Park, S.-R., et al. (2010). 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5' -AGCT-3' -rich switch regions for class switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1124–1135.
- Yadav, A., Olaru, A., Saltis, M., Setren, A., Cerny, J., and Livák, F. (2006). Identification of a ubiquitously active promoter of the murine activation-induced cytidine deaminase (AICDA) gene. *Mol. Immunol.* 43, 529–541.
- Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2004). IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem. Sci.* 29, 72–79.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482.
- Yang, B., House, M.G., Guo, M., Herman, J.G., and Clark, D.P. (2005). Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 18, 412–420.
- Yang, L., Kotomura, N., Ho, Y.-K., Zhi, H., Bixler, S., Schell, M.J., and Giam, C.-Z.

(2011). Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J. Virol.* **85**, 3001–3009.

Yashiki, S., Fujiyoshi, T., Arima, N., Osame, M., Yoshinaga, M., Nagata, Y., Tara, M., Nomura, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., et al. (2001). HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**, 1047–1061.

Yébenes, V.G. de, Belver, L., Pisano, D.G., González, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., and Ramiro, A.R. (2008). miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J. Exp. Med.* **205**, 2199–2206.

Yin, J., Harpaz, N., Tong, Y., Huang, Y., Laurin, J., Greenwald, B.D., Hontanosas, M., Newkirk, C., and Meltzer, S.J. (1993). p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* **104**, 1633–1639.

Yoshida, M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 475–496.

Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 2031–2035.

Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. *J. Virol.* **82**, 9359–9368.

Yu, K., and Lieber, M.R. (2003). Nucleic acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair* **2**, 1163–1174.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**, 460–463.

Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **5**, 1275–1281.

Zeng, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, A.R., and Gearhart, P.J. (2001). DNA polymerase η is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat. Immunol.* **2**, 537–541.

Zhang, T., Franklin, A., Boboila, C., McQuay, A., Gallagher, M.P., Manis, J.P., Khamlichi, A.A., and Alt, F.W. (2010). Downstream class switching leads to IgE antibody production by B lymphocytes lacking IgM switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3040–3045.

Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1997). The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* **89**, 413–424.

Résumé

Le cancer, qui représente la première cause de mortalité en France, a dans environ 25% des cas une origine virale. Dans ce contexte le virus HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus Type 1) est l'agent étiologique d'une forme très agressive de leucémie et/ou de lymphome appelée ATL (Adult T-cell Leukemia), caractérisée par une grande instabilité génétique et chromosomique. Cette pathologie se développe après une phase asymptomatique de plusieurs décennies et ne connaît à se jour aucun traitement efficace. Parmi l'ensemble des protéines virale, La protéine Tax joue un rôle crucial dans la transformation cellulaire notamment en activant des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie, mais aussi en contrôlant des étapes clefs de la régulation du cycle cellulaire et de la réparation des endommagements de l'ADN.

Mon travail de thèse a consisté, dans un premier temps, à étudier le rôle de l'enzyme AID (Activation-induced cytidine deaminase) dans l'instabilité génomique des lymphocytes T. Nos résultats démontrent que AID est exprimée dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1, que son expression est induite par la protéine virale Tax et que l'enzyme est fonctionnelle. En utilisant différentes techniques nous avons pu démontrer que AID induit une désamination des deoxycytidines en deoxyuraciles *in vitro* et des endommagements de l'ADN, de type cassures de l'ADN, dans les cellules infectées par HTLV-1 ou transfectées par Tax. L'accumulation de ces endommagements pourrait participer à la transformation cellulaire au cours de l'infection par HTLV-1 suggérant ainsi un rôle de AID dans la leucémogénèse associée à HTLV-1.

La longue période de latence avant le développement de l'ATL suggère la mise en place de mécanismes de survie dans les cellules infectées par HTLV-1. Nous avons donc en parallèle étudié les mécanismes de régulation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bfl-1 et son implication dans la survie des cellules infectées. Nous avons démontré que la protéine Tax induit l'expression de Bfl-1 via les voies NF- κ B et AP-1, mais aussi qu'une seconde protéine virale, la protéine HBZ est capable de moduler l'expression de Bfl-1 induite par Tax. En complément, l'utilisation de shRNA spécifiques de Bfl-1 nous a permis de mettre en évidence le rôle de Bfl-1 dans la survie des cellules infectées ainsi que dans la chimiorésistance de lignées T infectées par HTLV-1. Bfl-1 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'ATL.

Abstract

Cancer, which is the leading cause of death in France, has a viral origin in about 25% of cases. In this context, HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus Type 1) is the etiologic agent of a very aggressive form of leukemia/lymphoma called ATL (Adult T-cell Leukemia), characterized by genetic and chromosomal instability. ATL occurs after an asymptomatic period of several decades and to date there is no effective treatment. Among all the viral proteins, Tax protein plays a crucial role in cell transformation especially by activating transcription factors involved in proliferation and survival, but also by controlling the key steps of the cell cycle regulation and the DNA damage response.

The aim of my PhD work was, firstly, to investigate the role of the enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase) in the genomic instability of T cells. Our results demonstrate that AID is expressed in HTLV-1-infected CD4⁺ T cells, that its expression is induced by the viral protein Tax and that AID is functional. Using different techniques we have demonstrated that AID induces deamination of deoxycytidines into deoxyuracils *in vitro* and DNA damage, like DNA breaks, in HTLV-1-infected or Tax-expressing cells. Accumulation of DNA damage could be involved in cellular transformation of HTLV-1-infected cells, suggesting a role of AID in leukemogenesis associated with HTLV-1.

The long latency period before the development of ATL suggests establishment of survival mechanisms in HTLV-1-infected cells. Thus we studied the mechanisms regulating the expression of anti-apoptotic Bfl-1 protein and its involvement in the survival of infected cells. We have shown that Tax protein induces expression of Bfl-1 via the NF- κ B and AP-1 pathways, but also that a second viral protein, HBZ, is able to modulate Bfl-1 expression induced by Tax. In addition, the use of Bfl-1 specific shRNA allowed us to highlight the role of Bfl-1 in survival of infected cells as well as in chemoresistance of HTLV-1-infected T cell lines. Thus Bfl-1 appears as a potential therapeutic target in the treatment of ATL.

Mots clés : HTLV-1, ATL, Tax, AID, BFL-1, NF- κ B, instabilité génomique, apoptose, leucémie, lymphome