

## Le rôle ambivalent de l'interféron alpha au cours des infections par HTLV-1 et HTLV-2

Anne Cachat

## ► To cite this version:

Anne Cachat. Le rôle ambivalent de l'interféron alpha au cours des infections par HTLV-1 et HTLV-2. Virologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2014. Français. NNT: 2014ENSL0907. tel-01165959

## HAL Id: tel-01165959 https://theses.hal.science/tel-01165959

Submitted on 21 Jun 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.

## THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

#### Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon Discipline : Sciences de la vie

Centre International de Recherche en Infectiologie Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

présentée et soutenue publiquement le 20 juin 2014 par

### Anne CACHAT

Directeur de thèse : Pr Renaud MAHIEUX

## Le rôle ambivalent de l'interféron $\alpha$ au cours des infections par HTLV-1 et HTLV-2



Après l'avis de :

Pr Charles BANGHAM Dr Eliane MEURS Rapporteur Rapportrice

Devant la commission d'examen formée de :

Pr Charles BANGHAM Dr Denis GERLIER Pr Olivier HERMINE Pr Renaud MAHIEUX Dr Eliane MEURS Dr Olivier SCHWARTZ Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse Rapportrice Examinateur

#### REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon travail, Eliane Meurs et Charles Bangham pour avoir accepté de juger mon manuscrit, Denis Gerlier, Olivier Hermine et Olivier Schwartz pour participer à mon jury.

Je remercie mon directeur de thèse Renaud Mahieux, pour m'avoir permis de travailler ces trois années sur un sujet qui m'a passionnée, pour m'avoir fait confiance et donner la liberté de conduire mes expériences comme je le souhaitais. Merci pour toutes les discussions, pour ton écoute mais également pour les bons moments sportifs partagés en dehors du laboratoire.

Merci à tous les collègues qui m'ont aidée au quotidien. Hélène, pour les discussions bibliographiques sur l'interféron. Sandrine, pour compenser ma petite taille à l'azote, m'avoir autorisée mes saute-moutons pas très hygiène et sécurité mais aussi pour avoir toujours été partante pour les sorties sportives et alcoolisées ! Et je n'oublierai pas mon maître des westerns, de la culture cellulaire, de la luciférase et tant d'autres choses encore, Sebseb...merci absolument pour tout. Sandrine et Sebseb bien plus que des collègues vous êtes devenus de vrais amis toujours là pour rigoler et mais aussi m'écouter et m'encourager. Je remercie aussi tous les membres passés et présents de l'équipe OR, de nos acolytes les LR ainsi que Franck, Morgan et Vincent du LBMC.

Je remercie également les personnes qui m'ont permis de m'épanouir dans l'enseignement et en particulier Nathalie Alazard Dany pour m'avoir donnée l'occasion de participer aux cours alter-disciplinaires qui furent une expérience riche en anecdotes !

Durant ces trois années de thèse, j'ai fait des découvertes scientifiques intéressantes bien sûr mais également de très belles découvertes humaines :

Je remercie tous les amis avec qui j'ai partagé de magnifiques moments d'évasion qui m'ont permis de revenir chaque lundi avec le sourire (et des courbatures !): Mak et Barnab pour ma plus belle mais aussi plus douloureuse sortie en ski de rando, Putu, Coco, Avé, Bouboule et Soso pour les randonnées à ski, à pied, sur les rochers, Putu pour ce voyage inoubliable, Alexa et Nico pour toutes les belles descentes des Grands-Montets, Chaton et Renardeau pour les petits dej avec le miel des Cévennes et les pique-niques saucisse au pied des falaises, les banana splits pour les courses dans le froid, la neige, le noir, la boue et ce magnifique dernier classement !

Merci aux amis avec qui j'ai passé de bons moments et surtout apprécié discuter de tout, de rien, toutes ces choses si importantes finalement : Elise, Ponette, Anne-céc, Ferdi (merci aussi à tes lunettes cassées), Flore et Anaïs, Pauline M., Léo, les copines

du judo, Vomito, Sandrine ma colloc des week-end, Rita, Lisounette, Sara, Domit, Lénouche, Quentinou, Céline, Sam...

Un grand merci à mes amis lyonnais avec qui j'ai partagé tous les hauts et les bas ces sept dernières années. Nath et bien sûr mes deux collocs d'adoption Bibine et Flominou. Nath merci pour ta gentillesse et les bons moments passés à papoter, surtout à la lueur d'une bougie pendant une tempête ! Bibine un grand merci pour ta bonne humeur contagieuse, ta sincérité et bien sûr...la gnôle de cerise ! Flominou, merci pour ton écoute, c'est aussi toujours un plaisir de repenser le monde scientifique avec toi, et d'imaginer des projets un peu fous voire de les réaliser !

Marc je te remercie pour toutes les échappées des week-end, au bord d'une rivière, dans les montagnes ou la nuit au milieu des cochons... Un grand, grand, énorme merci pour ta présence et ton soutien cette année, que tu sois tout près ou de l'autre côté de la Méditerranée ! Merci aussi de t'être replongé dans les voies de signalisation, la virologie et ses abréviations, et pire encore... word ! Merci pour toutes tes suggestions !

Enfin en écrivant ce manuscrit, je réalise que je tourne une page, laissant derrière moi trois années de thèse mais bien d'autres années encore. En me remémorant ces années passées, je tiens à remercier les personnes qui ont toujours été à mes côtés. En particulier Berthoud et Ginger pour tous les conseils frérots, et tous ces instants partagés ensemble. Enfin Pater et Mutti. Bien plus à l'aise pour me plaindre à propos d'un certain pantalon jaune, je n'ai jamais vraiment pris l'occasion de vous remercier. Merci de m'avoir accompagnée ces dernières années, d'avoir compati à mes problèmes d'anticorps, de westerns, de cellules contaminées, merci d'avoir essayé de comprendre ce qu'était ce zyglotron qui pouvait inhiber des virus aux noms bizarres. Je pense aussi à toutes ces autres années...Merci de m'avoir toujours encouragée, de m'avoir conduit dans Paris à 4 heures le matin, d'avoir penché à mes côtés sur les problèmes de suites et limites de monsieur Deschamps, d'avoir parcouru le dictionnaire franco-allemand les week-ends. Merci enfin de me soutenir dans tous mes projets, les plus farfelus soient-ils mais si importants à mes yeux : merci Pater pour le coaching course dans le froid et le noir, merci Mutti de m'avoir suivie dans l'entrainement mont-blanc, merci à tous les deux de m'avoir amenée dans les coins les plus charmants des Yvelines, voir jusqu'en Seine-et-Marne la veille du bac. Merci est un petit mot, si petit que je vous l'ai rarement dit, alors je vous l'écris en gros ici : MERCI.

#### RESUME

#### Le rôle ambivalent de l'interféron $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2

HTLV-1 et HTLV-2 sont des virus provoquant des infections persistantes. Après une période de latence clinique de plusieurs décennies, 2 à 5 % des individus infectés par HTLV-1 développent des pathologies comme la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) ou la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM). Malgré une forte homologie avec HTLV-1 dans son organisation génomique et sa séquence nucléotidique, l'infection par HTLV-2 n'est pas associée à des désordres hématologiques. L'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) est un acteur majeur de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Le rôle de la réponse IFN- $\alpha$  au cours d'une infection par HTLV-1 et notamment dans le développement de l'ATL reste peu documenté et controversé. Mon travail de thèse a consisté à caractériser le rôle de l'IFN- $\alpha$  sur l'infection par HTLV-1 en comparaison de l'infection par HTLV-2. Nous avons montré que l'infection de novo de lymphocytes T par HTLV-1 ou HTLV-2 était inhibée par l'IFN- $\alpha$ . Cette inhibition repose sur l'activation (phosphorylation) de la protéine PKR par l'IFN- $\alpha$  qui réprime les étapes tardives du cycle viral. D'autre part, nous avons étudié le rôle de la protéine ADAR1-p150 dont l'expression est aussi induite par l'IFN- $\alpha$ . La protéine ADAR-1-p150 est surexprimée dans les lymphocytes primaires activés et dans des lymphocytes infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Nous avons montré que la protéine ADAR-1-p150 contrecarrait l'effet inhibiteur de l'IFN- $\alpha$ sur le cycle d'HTLV-1 et d'HTLV-2, grâce à sa capacité à inhiber l'activation de PKR. Ces résultats suggèrent qu'un équilibre entre l'expression de ces 2 protéines peut influer sur le déroulement de l'infection par HTLV-1 ou HTLV-2. Enfin, nous avons observé que l'IFN-a n'avait pas d'effet sur des cellules déjà infectées par HTLV-1 contrairement à HTLV-2 qui reste partiellement sensible à cette cytokine. Un rôle différent de l'IFN- $\alpha$  sur HTLV-1 et HTLV-2 pourrait être à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus.

Mots clés : HTLV-1, HTLV-2, ATL, IFN- $\alpha$ 

#### SUMMARY

#### The ambivalent role of interferon $\alpha$ in HTLV-1 and HTLV-2 infections

HTLV-1 and HTLV-2 viruses are responsible for life-long infections. After a long latency period, 2 to 5 % of HTLV-1 infected people develop diseases such as Adult T cell leukemia (ATL) or Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 associated Myelopathy (TSP/HAM). Although both viruses are very similar in their genomic organization and in their nucleotide sequence, HTLV-2 has not been associated to any malignant hematological disorders. Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) plays a major role in host innate immune response. The role of IFN- $\alpha$  during HTLV-1 infection and ATL onset has poorly been investigated and results are controversial. My project was aimed at characterizing the role of IFN- $\alpha$  in HTLV-1 infection compared to HTLV-2 infection. We showed that IFN- $\alpha$ inhibits HTLV-1 and HTLV-2 de novo infection in T-cells. This inhibition is mediated through PKR activation (phosphorylation) that prevents the latest steps of the viral cycle. We also studied the effect of ADAR-1-p150 whose expression is also induced by IFN- $\alpha$ . We showed that ADAR-1-p150 counteracts the inhibitory effect of IFN- $\alpha$  on HTLV-1 and HTLV-2 cycles, through inhibition of PKR activation. These results suggest that a balance between ADAR-1-p150 and PKR expression could influence HTLV-1 and HTLV-2 infection. Furthermore we observed that IFN- $\alpha$  has no effect on HTLV-1 infected cells whereas HTLV-2 infected cells are still sensitive to the cytokine. A different effect of IFN- $\alpha$ on HTLV-1 and HTLV-2 could be involved in the distinct pathological outcomes of HTLV-1 or HTLV-2 infection.

Keywords : HTLV-1, HTLV-2, ATL, IFN- $\alpha$ 

### TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Découverte de HTLV-1 et HTLV-2 parmi des faits marquants de la virologie
Figure 2 : Les cycles de HTLV-1 et HTLV-224
Figure 3 : Structure des particules virales de HTLV-1 et HTLV-2
Figure 4 : Organisation génomique de HTLV-1 et HTLV-2 et activation de la transcription des
gènes viraux par Tax1 et Tax227
Figure 5 : Mécanismes d'attachement et d'entrée de HTLV-1 et HTLV-2
Figure 6 : Les spécificités de la transmission de HTLV-1 d'une cellule infectée à une cellule cible 33
Figure 7 : Répartition des clones de cellules infectées chez des patients infectés par HTLV-1 ou
par HTLV-2
Figure 8 : Répartition géographique de HTLV-1 et HTLV-2
Figure 9 : Origine et évolution de HTLV-141
Figure 10 : Origine et évolution de HTLV-243
Figure 11 : Pathologies associées à HTLV-1 et HTLV-245
Figure 12 : Clonalité chez un patient infecté par HTLV-1 et développant une ATL46
Figure 13 : Fonctions pléiotropiques de Tax    50
Figure 14 : Implication des protéines Tax et HBZ dans le développement de l'ATL53
Figure 15 : Modèles de pathogenèse de la HAM/TSP expliquant la mort des cellules gliales
Figure 16 : Nombre absolu de lymphocytes dans le sang chez des patients non infectés ou
infectés par HTLV-1 ou HTLV-261
Figure 17 : Domaines des protéines Tax1 et Tax2    62
Figure 18 : Localisation des protéines Tax1 et Tax2
Figure 19 : Domaines des protéines HBZ et APH-267
Figure 20 : Localisation des protéines HBZ et APH-267
Figure 21 : La clonalité des patients infectés par HTLV-1 ou HTLV-269
<b>Figure 22</b> : Production des interférons de type I (IFN- $\alpha$ et IFN- $\beta$ ) <b>73</b>
Figure 23 : Voie de signalisation des interférons de type I (IFN- $\alpha$ et IFN- $\beta$ )75
Figure 24 : Différents types d'infections virales
Figure 25 : Inhibition de la production des interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) par les virus persistants85
Figure 26 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à
l'échelle de l'organisme lors d'une infection par des herpesviridae
Figure 27 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à
l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le virus de l'hépatite B
Figure 28 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à
l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le virus de l'hépatite C90
Figure 29 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à
l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le VIH-191

Figure 31 : Modèle hypothétique conciliant les rôles ambivalents de la protéine PKR lors d'une	
infection par le virus de l'hépatite C	97
Figure 32 : Implication de l'IFN- $\beta$ dans la progression d'une infection par HPV vers un cancer	
cervical	100
Figure 33 : Implication de l'interféron $\alpha$ produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans	
l'apoptose des lymphocytes T CD4+ chez des patients infectés par VIH-1	103
Figure 34 : Le rôle des interférons de type I dans la persistance d'une infection virale	105
Figure 35 : Rôle ambivalent des interférons de type I et modèle d'implication de la réponse	
interféron de type I dans les pathologies associées aux infections virales persistantes	106
Figure 36 : L'IFN- $\alpha$ inhibe l'infection <i>de novo</i> de lymphocytes par HTLV-1 et HTLV-2	18 <b>9</b>
Figure 37 : La dualité ADAR1-PKR au cours d'une infection par HTLV-1 ou HTLV-2	195
Figure 38 : Modèle hypothétique liant l'effet distinct de l'IFN- $\alpha$ sur les infections par HTLV-1 et	
HTLV-2 à la différence de pathogénicité entre les deux virus	197
Figure 39 : Rôle ambivalent de l'IFN- $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2	199

29
48
65
68
75
81
85
93

#### — Abréviations —

### ABREVIATIONS

Α	
ADAR	Adenosine Deaminase Acting on RNA
ATF/CREB	Activating Transcription Factor/cAMP response element binding protein
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AP-1	Activator Protein 1
APC	Antigen Presenting Cells
APH-2	Antisens Protein of HTLV-2
ATL	Adult T-Cell Leukemia (Leucémie à cellules T de l'adulte)
AZT	Azidothymidine
В	
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BLV	Bovin Leukemia Virus
С	
СА	Protéine de Capside
CARM1/SMYD3	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1/SET and
	MYND domain containing 3
CBP	CREB Binding Protein
CCR4	C-C Chemokine receptor type 4
CDC20	Cell-division cycle protein 20
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKN2A, 2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, 2B
CHK1, 2	Checkpoint kinase 1,2
СМН	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CREM	cAMP response element modulator
D	
DAI	DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors
E	
E2F1	E2F transcription factor 1
EBV	Epstein-Barr Virus
eiF2α	Eukaryotic translation initiation Factor $2\alpha$
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Elk-1	ETS Domain-Containing Protein Elk-1
F	
Foxp3	Forkhead Box Protein3
G	
GLUI-1	Glucose Transporter 1

Н	
HAM/TSP	HTLV-1 Associated Myelopathy/trpical spastic paraparesis (paraparésie spastique tropicale ou myélopathie induite par HTLV-1)
HBV	Virus de l'Hépatite B
HCV	Virus de l'Hépatite C
HDAC	Histones désacétylases
hDLG	human Drosophila Large Disc
HHV3,4,5,6,7,8	Human Herpes Virus 3,4,5,6,7,8
HPV	Human Papillomavirus
hSCRIB	human Scribble
HSPG	Héparanes Sulfates à Protéoglycanes
HSV-1,2	Herpes Simplex Virus 1,2
HTLV-1, 2, 3	Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1,2, 3 (Virus T-
	lymphotrope humain 1, 2, 3)
I	
- IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1
IEN-α.β.γ	Interférons $\alpha.\beta.y$
IFNAR1.2	Interferon-α/β receptor 1.2
ΙκΒα.γ	Inhibitor of kappa Ba.y
ΙΚΚα.β.ν/ΝΕΜΟ	IKB Kinase $\alpha_{.\beta_{.}}$ /NF-kB Essential Modulator
IL-2	Interleukine-2
ILT7	Immunoglobulin-like transcript 7
IRF-3,7,9	Interferon Regulatory transcription Factor 3,7,9
ISG	Interferon Stimulated Genes
ISRE	Interferon-sensitive response element
J Jok1	Janua Activated Kinasa 1
Jaki	Janus Activated Kinase T
L	
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	Long Terminal Repeats
Μ	
МА	Protéine de Matrice
MAD	Mitotic Arrest Defective
MAP kinases	Mitogen-Activated Protein kinases
MAVS/IPS-1	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein IFN-B Promoter
	Stimulator 1
MCPyV	Merkel cell Polyomavirus
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated gene 5
Mx1	Myxovirus Resistance 1

#### — Abréviations —

Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
N NC NF-KB NK	Protéine de Nucléocapside Nuclear Factor-Kappa B Natural Killers
<b>O</b> 2'5'OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1
P PAMPS PBAF P-bodies pCAF pDC PDM PDZ PHA PI3K PKR PRR PTLV	Pathogen Associated Molecular Patterns Polybromo-associated BAF Processing Bodies p300/CBP Associated Factor plasmacytoid Dendritic Cells PDZ Binding Motif PSD95, Dlg, ZO1 Phytohémagglutinine Phosphoinositide 3-kinase Protein Kinase R Pathogen Recognition Receptors Primate T Lymphotropic Virus (Virus de Primates T Lymphotropes)
<b>R</b> RANBP1 Rb ReIA RIG-I RLR	RAN binding protein 1 Retinoblastoma Protein v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A Retinoic acid-Inducible Gene 1 RIG-I-Like Receptors
<b>S</b> SAP-1 SIDA Smad2, 3, 4 SOCS1 SRF STAT1,2 STLV-1,2,3 SW1/SNF	SRF Accessory Protein 1 Syndrôme de l'Immunodéficience Humaine Small Mothers Against Decapentaplegic 2,3,4 Suppressor of cytokine signaling 1 Serum Response Factor Signal Transducer and Activator of Transcription 1,2 Simian T cell Leukemia/lymphoma virus type 1,2, 3 (Virus T- lymphotrope simian 1,2,3) SWItch/Sucrose NonFermentable
<b>T</b> TAK TAR Tax	TGF beta Activated Kinase Transactivator Response Element Transcriptionnal Activator of pX region

——— Abréviations —

TAX1BP1	Tax1 Binding Protein 1
TCR	T cell receptor
TF <sub>II</sub> A, <sub>II</sub> D	Transcription Factor "A, "D
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TORC-1,2,3	Transcriptional coactivator for CREB1
TP53INP1	Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRBP	TAR RNA binding protein
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRIM5α	Tripartite motif-containing protein 5
Tyk2	Tyrosine Kinase 2
U	
USP18, 20	Ubiquitin-specific protease 18, 20
V	
VIH-1, 2	Virus de l'Immunodéficience Humaine 1, 2
VMT	Virus de la Mosaïque du Tabac
VZV	Virus de la Varicelle et du Zona
x	
XBP-1	X-box binding protein 1

## Table des matières

INTRODUCTION	17
I. HTLV-1 et HTLV-2, les premiers rétrovirus humains découverts	19
1. Les premiers pas de la virologie	19
2. De l'identification des premiers rétrovirus animaux à la découverte de HTLV-1 et	t
HTLV-2	22
II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences	
épidémiologiques	25
1. Généralités sur les cycles des rétrovirus	25
2. HTLV-1 et HTLV-2, des particules virales relativement similaires	25
3. HTLV-1 et HTLV-2, des génomes complexes	26
4. HTLV-1 et HTLV-2, les particularités de la réplication au sein d'un individu	
infecté	28
<ul> <li>HTLV-1 et HTLV-2, des tropismes cellulaires différents</li> </ul>	28
HTLV-1 et HTLV-2, des mécanismes d'entrée distincts	29
Les particularités de la transmission de HTLV-1 et HTLV-2 d'une cellule infectée è une cellule cible	20
<ul> <li>I es spécificités de la persistance de HTI V-1 et HTI V-2 au sein d'un</li> </ul>	52
individu infecté	35
5. HTLV-1 et HTLV-2, des répartitons géographiques actuelles distinctes	37
<ol> <li>HTLV-1 et HTLV-2, des histoires évolutives différentes</li> </ol>	40
<ul> <li>HTLV-1, différents épisodes de transmissions Singe-Homme et de</li> </ul>	
migrations de populations	41
<ul> <li>Origine et évolution de HTLV-2, une histoire plus complexe</li> </ul>	42
III. Pathologies associées à HTLV-1 et HTLV-2 : HTLV-1 un virus oncogène,	
HTLV-2 un virus n'induisant pas de leucémie	45
1. La leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) causée par HTLV-1	46
L'ATL, une maladie rare mais aggressive	46
L'ATL, rôle de la protéine Tax dans la transformation cellulaire	49
<ul> <li>L'ATL, rôle de l'ARNm et de la protéine HBZ dans la prolifération et la transformation sollulaire</li> </ul>	50
transformation cellulaire	50 52
<ul> <li>I 'ATL, on processos manacioner encore mar caracterise</li> <li>I 'ATL, peu de traitements efficaces</li> </ul>	54
2 Autres pathologies liées à HTI V-1	56
• La HAM/TSP une pathologie inflammatoire	56
<ul> <li>Autres pathologies induites par HTLV-1</li> </ul>	58
3. HTLV-2. un virus pathogène ?	58

Table		
Ianie	nes	matieres
IUNIC	<b>a</b> 00	111010100

•	Maladies inflammatoires et respiratoires chez les patients infectés par HTLV-2	58
•	HTLV-2, un virus n'induisant pas de leucémie	60
4. Etude o	comparative de HTLV-1 et HTLV-2 en lien avec la différence de	
pathogén	icité entre les deux virus	61
•	Etude comparative de Tax1 et Tax2	61
•	Etude comparative de HBZ et APH-2	66
•	Etude comparative de la clonalité entre des individus infectés par HTLV- et HTLV-2	1 68
IV. Le rôle d	les interférons de type I dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2, ui	n 70
1. Les int	terférons, des acteurs majeurs du système immunitaire	70
•	La reponse interferon au sein du systeme immunitaire	70
•	La production des interferons de type i	71
•	diversité des rôles des interférons de type l	72
2 L'offet	des interférence de type Lau cours des infections par $HTLV(1 \text{ of } HTLV(2 \text{ of } TLV))$	100
données	incomplètes et contradictoires	76
V. Vers un r par des infe	nodèle liant l'effet des interférons de type l aux pathologies induites ections virales persistantes	79
1. Infection dans la p	ons virales persistantes et problématique du rôle des interférons de type l persistance des infections	79
2. Les int	fections virales persistantes induisent-elles une production des interférons	3
de type I	?	82
•	Production d'interférons de type I par les cellules infectées	82
•	Le cas particulier de la production d'interféron $lpha$ par les cellules	
	dendritiques plasmacytoïdes	83
•	Inhibition de la production d'interférons de type I par les virus persistants	; à
	l'échelle cellulaire	84
•	Qu'en est-il à l'échelle de l'organisme ?	87
3. Quel e	st l'effet des interférons de type I sur la réplication des virus persistants?	92
•	Inhibition de la réplication des virus persistants par l'expression des gène de réponse à l'interféron à l'échelle cellulaire	əs 92
•	Inhibition par les virus persistants des fonctions médiées par les interfére	ons
	de type I à l'échelle cellulaire	92
•	Les interférons de type I, un effet bénéfique ou délétère pour l'organisme lors des infections virales persistantes ?	; 98
4. Modèle	e reliant l'effet des interférons de type I aux pathologies induites par les	
infections	virales persistantes	103
•	Le rôle des interférons de type I dans la persistance de l'infection	103

<ul> <li>Implication d'une activation chronique de la voie des interférons de typ dans les pathologies</li> </ul>	e I 104
PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE	109
RESULTATS	111
I. Article 1 : L'interféron $lpha$ inhibe l'infection de novo par HTLV-1 et HTLV-2 via l'activation de PKR	ء 113
1. Contexte de l'étude et principaux résultats	113
2. Article	114
II. Article 2 : ADAR1 stimule la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 indépendamm	nent
de son activité d'éditing mais via l'inhibition de PKR	126
1. Contexte de l'étude et principaux résultats	126
2. Article	127
3. Résultats complémentaires	176
III. Résultats complémentaires : Les cellules infectées par HTLV-1 sont	
insensibles à l'IFN- $lpha$ contrairement aux cellules infectées par HTLV-2	177
1. Contexte de l'étude	177
2. Matériels et méthodes	177
3. Résultats	180
4. Perspectives	184
DISCUSSION	185
I. L'IFN-α inhibe l'infection <i>de novo</i> de lymphocytes par HTLV-1 et HTLV-2	187
II. La compréhension de l'effet de l'IFN- $lpha$ sur HTLV-1 : vers une amélioration traitements des pathologies liées à HTLV-1 ?	des 190
III. ADAR1, une protéine induite par l'IFN- $lpha$ qui stimule la réplication de HTLV HTLV-2	′-1 et 191
IV. La dualité ADAR1-PKR, un rôle dans la persistance de l'infection ?	194
V. Un rôle différent de l'IFN- $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2 : une implication dans la différence de pathogénicité entre les deux virus ?	196

VI. La différence de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2 : une histoire de coévolution hôte-pathogène ?	200
BIBLIOGRAPHIE	203
ANNEXES	219

# INTRODUCTION

#### I. HTLV-1 et HTLV-2, les premiers rétrovirus humains découverts

#### 1. Les premiers pas de la virologie

Les maladies causées par des virus sont évoquées depuis des siècles. La poliomyélite, maladie handicapante causée par le poliovirus, est évoquée sur des hiéroglyphes représentant des personnages aux membres atrophiés et marchant avec l'aide de béquilles (Figures 1.A et 1.B). Quelques siècles plus tard, Hippocrate (460-370 avant J-C) observe des éruptions cutanées au niveau des lèvres qu'il appelle herpès. Aristote (384-322 avant J-C) décrit les symptômes de la rage. Mais alors que des maladies virales sont décrites depuis des millénaires, les virus, dont le mot vient étymologiquement du latin et signifie poison, ont été identifiés il y a peine plus de cent ans.

En 1892 un botaniste russe, Dimitri Ivanoski, étudie une maladie contagieuse provoquant la nécrose des feuilles de plants de tabac, la mosaïque du tabac (Figures 1.A et 1.C). Afin d'observer si la maladie est causée par un agent transmissible, Ivanoski broie des feuilles de plants malades, passe le broyat à travers un filtre de Chamberland conçu pour retenir les bactéries, et injecte le filtrat à des feuilles de plants sains. Ces derniers développent alors la maladie (Figure 1.D). Ivanovski suppose qu'une bactérie produit une toxine filtrable responsable de la maladie et ne poursuit pas ses expériences.

Six ans plus tard, les expériences d'Ivanoski sont reprises par un chercheur hollandais, Martinus Beijerinck (Figure 1.A). Selon le même principe, il filtre du broyat de feuilles "malades", l'injecte à une plante saine et répète l'expérience à partir de cette dernière nouvellement touchée par la maladie. Il réussit ainsi à transmettre la maladie à un deuxième plant initialement sain (Figure 1.D). Il en conclut qu'un agent pathogène filtrable, donc de taille bien inférieure à celle des bactéries, est responsable de la maladie. Par ailleurs, il observe que cet agent infectieux de petite taille ne se multiplie pas en solution et qu'il est dépendant de l'organisme hôte pour se reproduire, contrairement aux bactéries. Il nomme cet agent « *contagium vivum fluidum* » aujourd'hui connu sous le nom de virus ! Rapidement après la découverte de Beijerinck, deux scientifiques allemands, Friedrich Loeffler et Paul Frosch, observent que l'agent responsable de la fièvre aphteuse chez l'animal est de nature filtrable. Il s'agit donc du premier virus identifié chez l'animal. De la même façon, le premier virus infectant l'Homme est mis en évidence en 1901 par Walter Reed : le virus de la fièvre jaune (Figure 1.A).

Alors que l'identification de virus, définis à l'époque comme des agents filtrables responsables de maladies et nécessitant un hôte pour se répliquer, se multiplie, un débat s'ouvre concernant la nature même des virus : liquide comme le suggère Beijerinck ou

#### Introduction I. HTLV-1 et HTLV-2, les premiers rétrovirus humains découverts

particule solide ? Il a fallu attendre les années 1930 pour clore le débat (Figure 1.A). En 1935 Wendell M. Stanley réalise des cristaux protéiques à partir du virus de la mosaïque du tabac (VMT). Peu de temps après, Frederick C. Bawden et Norman W. Pirie découvrent que ces cristaux sont en réalité constitués d'associations d'acides nucléiques et de protéines définissant ainsi la composition d'un virus. L'invention du microscope électronique révolutionne le monde de la biologie et permet, pour la première fois, l'observation en image du VMT en 1939, (pour revue : Lustig *et* Levin, 1992,Flint *et al.*, Principles of Virology, 2009).

En 1957, André Lwoff publie la définition de la notion de virus en comparant des virus comme le bactériophage à des micro-organismes (Lwoff *et al.*, 1957). Un virus ne possède qu'un seul type d'acide nucléique, ARN ou ADN, se reproduit uniquement à partir de son matériel génétique et n'est constitué que de protéines et d'acides nucléiques. Un virus est incapable de croître ou de se diviser. Le génome d'un virus ne code pas pour des enzymes impliquées dans les réactions du métabolisme et utilise donc l'énergie produite par la cellule infectée pour ses propres réactions de synthèse. Par conséquent, Lwoff déclare qu'un virus est un parasite obligatoire de la cellule hôte. Lwoff pose également la question de la nature vivante ou non d'un virus, débat encore ouvert aujourd'hui.

Bien que des preuves témoignent de l'existence des virus depuis des millénaires, il a fallu seulement une cinquantaine d'années après l'identification du premier virus pour comprendre leur nature et les observer en microscopie ! Le rapide essor de la virologie, rendu possible par les progrès techniques en biologie mais aussi en chimie et physique, a permis de mettre au point de nouveaux vaccins, comme ceux contre le virus de l'hépatite B ou certains papillomavirus, ou encore d'identifier les causes de véritables fléaux actuels, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Aujourd'hui, les virus ne sont pas seulement étudiés en tant gu'agents responsables de maladies, mais aussi pour leur rôle dans l'évolution, modifiant les génomes et induisant une pression de sélection sur leurs hôtes. ou encore à des fins thérapeutiques, en tant que vecteur en thérapie génique ou en tant qu'agent oncolytique. Depuis la découverte du VMT en 1898, des nouveaux virus sont sans cesse identifiés (Figure 1.A). Ce fut encore le cas dernièrement avec le pandoravirus (Philippe et al., 2013), virus de la taille de certaines bactéries et codant plus de 2500 protéines, ou encore plus récemment le pithovirus, virus de 1,5  $\mu$ m de long (Figure 1.E), (Legendre et al., 2014). Ces découvertes récentes révolutionnent la définition des virus établie au début du 20ème siècle.

#### Introduction I. HTLV-1 et HTLV-2, les premiers rétrovirus humains découverts



#### Figure 1 : Découverte de HTLV-1 et HTLV-2 parmi des faits marquants de la virologie

(A) Dates importantes relatives à la virologie, (B) Hiéroglyphe représentant un individu atteint de la polyomyélite (Prescott *et al.*, Microbiologie, 2<sup>ème</sup> édition), (C) Feuille atteinte de la mosaïque du tabac (INRA), (D) Expériences d'Ivanovski (1892) et de Beijerinck (1898) ayant permis d'identifier et de définir le virus de la mosaïque du tabac (VMT), (E) Microscopie électronique du Pithovirus (Legendre *et al.*, 2014, barre = 100 nm), (F) Première microscopie électronique de HTLV-1 (Poiesz *et al.*, 1980, barre = 100 nm), (G) Cellules leucémiques dites "cellules en fleurs" d'un patient atteint de l'ATL (Uchiyama *et al.*, 1977), (H) Microscopie électronique de HTLV-2 (Gallo *et al.*, 1985)

## 2. De l'identification des premiers rétrovirus animaux à la découverte de HTLV-1 et HTLV-2

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, dont le génome est constitué de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive et se caractérisant notamment par la présence de la transcriptase inverse, enzyme découverte en 1970, qui permet de rétrotranscrire le génome viral en ADN double brin. Le premier rétrovirus animal est identifié en 1908 par l'équipe de Vilhelm Ellermann et Oluf Bang (Figure 1.A). L'équipe démontre qu'une leucémie érythroïde observée chez le poulet est due à un agent filtrable. Peu après, en broyant puis filtrant des tissus de sarcomes de poussin et en injectant le filtrat obtenu à un poussin sain, Peyton Rous démontre que le sarcome du poulet est dû à un rétrovirus, qui est alors nommé virus du sarcome de Rous.

Suit l'identification de virus provoquant des tumeurs chez la Souris, le Singe ou encore le Chat. La découverte de virus provoquant des tumeurs chez les animaux intensifie la recherche de virus oncogènes chez l'Homme. Le premier virus oncogène humain identifié est le virus d'Epstein-Barr, herpesvirus (virus à ADN), responsable notamment du lymphome de Burkitt. À la fin des années 1970 a lieu une course à la recherche d'un rétrovirus humain. De nombreuses études visent sans succès à identifier un rétrovirus dans différents types de tumeurs humaines. À la même époque, l'équipe de Robert Gallo est à la recherche de facteurs de croissance permettant la prolifération *ex vivo* de lymphocytes primaires issus du sang périphérique. Dans cette optique, il cultive des cellules de tissus d'origines variées, prélève le milieu de culture et l'ajoute à des lymphocytes de donneurs sains ou leucémiques. Ces expériences aboutissent à l'identification de l'interleukine-2 (IL-2), notamment produite par des lymphocytes stimulés avec de la phytohémagglutinine (PHA), (Morgan *et al.*, 1976, Ruscetti *et al.*, 1977).

Grâce à l'utilisation de l'IL-2, des collaborateurs de Robert Gallo établissent une lignée de lymphocytes immortalisés à partir de cellules d'un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T. En 1979, Bernard Poiesz, étudiant de Robert Gallo, réussit à détecter la présence de transcriptase inverse dans ces cellules en culture. Suit l'observation de particules rétrovirales en microscopie électronique (Figure 1.F). Le premier rétrovirus humain est ainsi découvert et est appelé HTLV-1 (Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1) (Figure 1.A), (Poiesz *et al.*, 1980, pour revue : Gallo, 2005). De façon intéressante, peu avant la découverte de HTLV-1, des chercheurs japonais ont défini un nouveau type de leucémie : la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL). Celle-ci affecte pratiquement exclusivement les adultes, notamment parmi des populations originaires de Kyushu au sud du Japon, est souvent associée à une inflammation des ganglions (lymphadénopathie), une augmentation de volume du foie et de la rate

#### Introduction I. HTLV-1 et HTLV-2, les premiers rétrovirus humains découverts

(hépatosplénomégalie) et à des manifestations cutanées. Les cellules leucémiques associées à cette maladie présentent des particularités morphologiques telles un noyau polylobé (Figures 1.A et 1.G), (Uchiyama *et al.*, 1977). L'équipe de Gallo détecte la présence d'anticorps dirigés contre le virus HTLV-1 dans des sérums de patients atteints par cette maladie nouvellement décrite. Il démontre ainsi que l'infection par le virus HTLV-1 est responsable de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL). De façon parallèle, une équipe japonaise isole et caractérise un rétrovirus en travaillant sur une lignée cellulaire établie à partir d'un patient atteint de la leucémie à cellules T de l'adulte et montre que ce virus est l'agent causal de la maladie. Ce virus est appelé ATLV (Yoshida *et al.*, 1982). Le séquençage et la comparaison des génomes de HTLV-1 et ATLV indiquent qu'il s'agit en fait d'un même virus qui garde alors le nom de HTLV-1 (Popovic *et al.*, 1982).

En 1982, l'équipe de Gallo rapporte l'identification d'un autre rétrovirus à partir de cellules d'un patient atteint d'une leucémie différente de l'ATL, la leucémie à tricholeucocytes (Figures 1.A et 1.H). Le sérum du patient permet l'immunoprécipitation de la protéine gag p24 de HTLV-1. De plus, une lignée cellulaire établie à partir de cellules de la rate du patient infecté exprime des antigènes qui semblent caractéristiques de HTLV-1. Cependant des tests de cross-réactivité montrent que le virus produit par la lignée cellulaire diffère de HTLV-1. Les auteurs concluent que ce virus appartient à la même famille que HTLV-1 et l'appellent HTLV-2 (Kalyanaraman *et al.*, 1982). Environ un an plus tard, la culture de cellules de patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), permet l'identification d'un autre rétrovirus, d'abord appelé LAV (Lymphadenopathy associated virus) par l'équipe de Luc Montagnier (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983) ou HTLV-3 par l'équipe de Robert Gallo (Popovic *et al.*, 1984) puis Virus de l'Immunodéficience humaine (VIH) en 1986 (Figure 1.A).

Peu après l'identification de HTLV-1 et HTLV-2, des homologues simiens de ces virus (STLV-1 et STLV-2) sont découverts chez plusieurs espèces de singes en Afrique et en Asie (pour revue : Gessain *et al.*, 2000). En 1994, STLV-3 est identifié chez un babouin (Goubau *et al.*, 1994), puis dans de nombreuses espèces africaines (pour revue : Mahieux *et* Gessain, 2011). En 2005, deux équipes identifient son homologue humain (HTLV-3) chez des individus asymptomatiques vivants au Cameroun (Calattini *et al.*, 2005, Wolfe *et al.*, 2005). Un quatrième rétrovirus, HTLV-4, est découvert chez un autre individu un peu plus tard (Wolfe *et al.*, 2005). Dernièrement, un homologue de HTLV-4 a été identifié pour la première fois chez des gorilles au Cameroun (Lebreton *et al.*, 2014). Les rétrovirus HTLV et leurs équivalents simiens STLV forment aujourd'hui le groupe des PTLV (Virus de Primates T Lymphotropes). Ils appartiennent à la sous-famille des Orthovirinae et au genre des Deltaretrovirus.

Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques



#### Figure 2 : Les cycles de HTLV-1 et HTLV-2

Après l'entrée des virus dans la cellule hôte (étape détaillée à la figure 5) il y a décapsidation, transcription inverse du génome viral ARN en ADN double brin, intégration du génome viral au génome cellulaire, transcription et traduction des ARNm viraux, transcription du génome viral puis assemblage des particules virales. La transmission de HTLV-1 et HTLV-2 d'une cellule infectée à une cellule cible nécessite un contact cellule-cellule (étape détaillée à la figure 6).



#### Figure 3 : Structure des particules virales de HTLV-1 et HTLV-2

(A) Les particules virales de HTLV-1 et HTLV-2 se composent d'une enveloppe lipidique intégrant les protéines d'enveloppe gp21 et gp46. Le génome ARN diploïde est associé aux protéines de nucléocapside (NC) et entouré par la capside (CA) puis la matrice (MA). Les protéases, intégrases, transcriptases inverses, Rnases H sont incluses dans les particules virales.

## II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

#### 1. Généralité sur les cycles des rétrovirus

La réplication des rétrovirus comporte différentes étapes. Le cycle débute par l'entrée du virus dans la cellule cible et la décapsidation. Suit la transcription inverse du génome viral ARN en ADN par la transcriptase inverse du virus. Cette étape est caractéristique des rétrovirus. Il y a ensuite import du complexe de pré-intégration dans le noyau et enfin intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Par la suite, si les conditions sont favorables, on peut observer la transcription des ARNm viraux puis leur traduction par la machinerie de biosynthèse cellulaire. Le génome viral est transcrit en ARN et empaqueté par les protéines du virus dans le cytoplasme. Les particules virales peuvent alors être relarguées. Ces étapes sont très peu étudiées pour HTLV-1 et HTLV-2 à l'exception de l'entrée, de la transcription et de la transmission du virus d'une cellule infectée à une cellule cible. Il est supposé que les autres étapes des cycles viraux sont similaires à celles des autres rétrovirus comme VIH-1 (Figure 2).

#### 2. HTLV-1 et HTLV-2, des particules virales relativement similaires

Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont l'enveloppe provient de la membrane plasmique de la dernière cellule infectée. L'enveloppe intègre deux protéines codées par le gène viral *env*. Dans les cas de HTLV-1 et HTLV-2 (Figure 3), le gène *env* code pour une polyprotéine clivée par une protéase cellulaire au niveau du réseau transgolgien en une protéine de surface gp46 et une protéine transmembranaire gp21 (pour revue : Jones *et al.*, 2011). La protéine de surface reste liée à la particule virale en interagissant avec la protéine transmembranaire. Sous l'enveloppe se trouve la matrice, constituée par un assemblage de protéines structurales p19 pour HTLV-1 et HTLV-2. La capside, structure protéique composée de protéines p24, protège le génome du virus. Ce dernier se compose de deux brins d'ARN (génome ARN diploïde) associés aux protéines de nucléocapside p15. La protéase, l'intégrase et la réverse transcriptase sont incluses dans la particule virale.

La morphologie des particules virales de HTLV-1 et HTLV-2 est difficile à étudier car les deux virus se répliquent peu. Récemment une analyse biophysique a permis de préciser l'organisation de la particule virale de HTLV-1. Des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant les protéines de matrice, capside et nucléocapside (*gag*) sous le contrôle d'un promoteur fort suivi d'une séquence de Kozak qui précède le codon initiateur de la traduction. Les 293T transfectées produisent ainsi un nombre plus

#### Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

important de particules virales. Ces dernières sont alors observées par cryo-microscopie électronique. Les auteurs montrent que les particules virales de HTLV-1 ont un diamètre d'environ 75 nanomètres contre 140 nanomètres pour VIH (Grigsby *et al.*, 2010). À ma connaissance, aucune étude similaire n'a été faite pour HTLV-2.

#### 3. HTLV-1 et HTLV-2, des génomes complexes

HTLV-1 et HTLV-2 présentent une organisation génomique similaire (pour revues : Johnson *et al.*, 2001, Rende *et al.*, 2012). Les deux génomes partagent 65% d'identité au niveau nucléotidique. Leur génome est un ARN simple brin de polarité positive de 9 kilobases environ (Figure 4). Comme les autres rétrovirus, les génomes de HTLV-1 et HTLV-2 présentent à leurs extrémités 5' et 3' des séquences répétées appelées LTR (long terminal repeats) divisées en trois régions : U3, R et U5. Ces séquences portent le promoteur viral.

De façon similaire aux autres rétrovirus, les génomes de HTLV-1 et HTLV-2 codent des protéines structurales et enzymatiques, Gag, Pro, Pol et Env (pour revue : Rende *et al.*, 2012). L'ARNm non épissé code pour la protéine Gag (p55) qui est ensuite clivée par la protéase virale en trois protéines : la protéine de matrice (MA, p19), la protéine de capside (CA, p24) et la protéine de nucléocapside (NC, p15). Ce même ARNm code pour la protéase et la polymérase qui sont synthétisées suite à un et deux décalages (frameshift) des ribosomes cellulaires sur l'ARNm viral permettant de changer de phase de lecture. Le précurseur de la protéine d'enveloppe est traduit à partir d'un ARNm mono-épissé.

Par comparaison avec les rétrovirus simples, les génomes de HTLV-1 et HTLV-2 contiennent une région supplémentaire en aval des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* appelée région pX (Figure 4). Celle-ci code notamment pour des protéines régulatrices comme Tax et Rex, codées à partir d'un même transcrit doublement épissé. Les protéines Tax1 et Tax2 ont un rôle majeur : elles induisent la transcription virale et sont donc appelées trans-activateurs viraux (pour revue : Currer *et al.*, 2012). Une fois le génome viral intégré dans le génome de la cellule cible, Tax1 et Tax2 interagissent avec des facteurs de transcription de la famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/cAMP response element binding). L'ensemble se fixe à des séquences situées au niveau de la région U3 des LTR appelées TRE (Tax Responsive Element). Une fois sur le promoteur viral les protéines Tax recrutent des histones acétyltransférases (CBP, p300, pCAF) qui décondensent la chromatine et stimulent la transcription des gènes viraux (Figure 4). Rex1 et Rex2 favorisent l'export des ARNm non épissés (comme celui codant Gag-Pro-Pol) et mono-épissés (comme celui codant Env). Alors qu'il était admis que Rex n'avait

#### Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques



#### Figure 4. Organisation génomique de HTLV-1 et HTLV-2 et activation de la transcription des gènes viraux par Tax1 et Tax2

Les génomes de HTLV-1 (A.) et présentent HTLV-2 (B.) une organisation similaire. Les deux génomes sont encadrés par les LTR aux extrémités 5' et 3'. Les gènes gag, pro, pol et env codent pour des protéines enzymatiques et structurales (bleu). De plus les génomes codent pour des protéines régulatrices (rouge) : Tax1/Tax2, Rex1/Rex2, HBZ/APH-2 et des protéines accessoires (gris). Les pointillés correspondent à des introns épissés. Les protéines Tax1 et Tax2 activent la transcription des gènes viraux à partir du LTR 5' : la région U3 du LTR comprend trois répétitions de 21 paires de bases constituant l'élément de réponse à Tax (TRE-1). La partie centrale de chaque TRE est homologue à l'élément de réponse à CREB (CRE). Tax1 et Tax2 interagissent avec CREB qui se lie à la séquence CRE. L'ensemble recrute des protéines coactivatrices (CBP/p300, pCAF, Nap1) qui acétylent les histones et modifient la compaction de la chromatine chromatine. La décondensée permet l'accès de la machinerie de transcription.

#### Introduction

#### II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

pas d'effet sur l'export des transcrits doublement épissés (comme les transcrits codant Tax et Rex), une étude récente montre qu'en absence de Rex, l'ARNm *tax/rex* est exporté de façon moins efficace, induisant une diminution de l'expression de Tax (Bai *et al.*, 2012, pour revue : Nakano *et* Watanabe, 2012). Ainsi Rex favorise l'export de l'ARNm *tax/rex* dans le cytoplasme bien que celui-ci puisse être exporté indépendamment de l'expression de toute protéine virale. La région pX code aussi pour des protéines accessoires (p12-p8, p13 et p30 pour HTLV-1, p10, p11 et p28 pour HTLV-2) qui ne sont pas nécessaires à l'expression des gènes viraux, la réplication du virus ou l'immortalisation de la cellule infectée *in vitro* mais sont utiles à la persistance des virus *in vivo* (pour revue : Bai *et* Nicot, 2012). De plus, le promoteur situé au niveau des régions R et U5 du LTR 3' permet la synthèse de protéines antisens : HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor) pour HTLV-1 et APH-2 (Antisens Protein of HTLV-2) pour HTLV-2 (Figure 4), (Gaudray *et al.*, 2002, Halin *et al.*, 2009).

## 4. HTLV-1 et HTLV-2, les particularités de la réplication au sein d'un individu infecté

#### • HTLV-1 et HTLV-2, des tropismes cellulaires différents

HTLV-1 et HTLV-2 infectent de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* (Tableau 1). *In vivo*, le tropisme des deux virus est plus restreint et spécifique à chacun (Tableau 1). HTLV-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4+ dont il peut induire la transformation, c'est à dire une prolifération indépendante de signaux de croissance (Richardson *et al.*, 1990). Les lymphocytes T infectés par HTLV-1 expriment des molécules, CD25 et FoxP3 par exemple, caractéristiques des lymphocytes T régulateurs dont la fonction est d'inhiber celle des lymphocytes T effecteurs. Cependant, les lymphocytes T régulateurs ne seraient pas des cibles du virus (Toulza *et al.*, 2009) ; l'expression de CD25 et FoxP3 serait induite par les protéines Tax et HBZ. HTLV-1 est aussi détecté *in vivo* dans les lymphocytes T CD8+ notamment ceux qui sont susceptibles d'être spécifiquement dirigés contre lui (Hanon *et al.*, 2000), dans les lymphocytes B, les monocytes (Koyanagi *et al.*, 1993) et les cellules dendritiques (Macatonia *et al.*, 1992). HTLV-2 a un tropisme préférentiel pour les lymphocytes T CD8+ *in vivo*, même si le virus semble aussi infecter les lymphocytes T CD4+ chez certains patients (Ijichi *et al.*, 1992, Melamed *et al.*, 2014).

Tropisme	HTLV-1	HTLV-2
In vitro	Nombreuses lignées	cellulaires
In vivo	- Lymphocytes T CD4+	- Lymphocytes T CD8+
	essentiellement	essentiellement
	- Lymphocytes T CD8+	- Lymphocytes T CD4+
	- Lymphocytes B	
	- Monocytes	
	- Cellules dendritiques	
	myléloïdes et	
	plasmacytoïdes	

Tableau 1 : Tropisme de HTLV-1 et HTLV-2 in vitro et in vivo

#### • HTLV-1 et HTLV-2, des mécanismes d'entrée distincts

Les rétrovirus infectent une cellule cible suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule ou avec la membrane de l'endosome à l'intérieur de la cellule. L'interaction entre la protéine de surface virale et son récepteur cellulaire provoque un changement de conformation de la protéine transmembranaire virale induisant la fusion.

Trois récepteurs cellulaires interviennent successivement dans l'attachement et l'entrée du virus HTLV-1 dans une cellule cible (Figure 5.A). Il s'agit des protéoglycanes à héparane sulfate qui sont des macromolécules associées à la surface cellulaire et à la matrice extra-cellulaire, du transporteur GLUT-1 qui facilite le transport du glucose à travers la membrane plasmique et de la neuropiline-1 qui est une protéine transmembranaire impliquée dans la croissance des neurones, la régulation de l'angiogenèse et de la réponse immune. Le modèle suivant est proposé concernant l'entrée de HTLV-1 (Ghez *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2011). Les macromolécules de protéoglycanes à héparane sulfate faciliteraient l'attachement du virus à la surface de la cellule en interagissant avec l'extrémité C-terminale de la protéine virale de surface gp46. Cette interaction concentrerait ainsi le virus à la surface cellulaire et faciliterait la liaison de gp46 à son premier récepteur, la neuropiline-1 qui est connue pour interagir avec les protéoglycanes. Cette dernière interaction engendrerait un changement de conformation de la protéine de surface, exposant alors ses sites de liaison au récepteur GLUT-1. La liaison gp46-GLUT-1 provoquerait le processus de fusion et l'entrée du virus (Figure 5.A).

GLUT-1 et la neuropiline-1 sont également impliqués dans l'entrée de HTLV-2 bien qu'aucun modèle d'entrée précis n'ait été établi de façon similaire à HTLV-1 (Figure 5.B), (Manel *et al.*, 2003, Ghez *et al.*, 2006). De façon intéressante, la dégradation

#### Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

enzymatique des protéoglycanes à héparane sulfate à la surface cellulaire diminue la liaison de la protéine de surface gp46 de HTLV-1 et l'infection par des particules virales pseudotypées avec la protéine d'enveloppe de HTLV-1 mais n'a pas d'effet sur l'infection par HTLV-2 (Jones *et al.*, 2006). Les protéoglycanes à héparane sulfate n'interviennent donc pas dans l'entrée de HTLV-2 contrairement à HTLV-1. HTLV-1 et HTLV-2 emploieraient donc des mécanismes d'entrée distincts.

Plusieurs études suggèrent que des mécanismes d'entrée différents entre les deux virus seraient à l'origine du tropisme distinct. En effet, des particules virales HTLV-1 pseudotypées avec les protéines d'enveloppe de HTLV-2 immortalisent préférentiellement les lymphocytes T CD8+ tandis qu'au contraire des particules virales HTLV-2 pseudotypées avec les protéines d'enveloppe de HTLV-1 immortalisent d'avantage les lymphocytes T CD4+ (Xie *et al.*, 2005). Cette étude suggère que l'enveloppe à elle seule est responsable du tropisme différentiel entre les deux virus. Il a été précisé que la protéine de surface, notamment l'acide aminé situé à la position 195, détermine le tropisme préférentiel d'immortalisation (Kannian et al., 2013). Par ailleurs, les lymphocytes T CD4+ présentent davantage de protéoglycanes à héparane sulfate à leur surface et peu de transporteur GLUT-1 en comparaison avec les lymphocytes T CD8+. Des lymphocytes T CD4+ surexprimant GLUT-1 sont infectés par HTLV-2. De même des lymphocytes T CD8+ surexprimant des protéoglycanes à héparane sulfate sont infectés par HTLV-1 (Jones et al., 2006). L'entrée de HTLV-2 ne dépend pas de la présence de protéoglycanes alors que cette présence est cruciale pour HTLV-1 expliquant le tropisme préférentiel de HTLV-2 pour les lymphocytes T CD8+. Des fortes concentrations de protéoglycanes à héparane sulfate et de neuropiline-1 sont déterminantes pour l'entrée de HTLV-1 (Jin et al., 2006) ce qui explique le tropisme préférentiel de HTLV-1 pour les lymphocytes T CD4+. Cependant la majorité de ces résultats est obtenue in vitro. Une étude montre que, in vivo chez le lapin, les deux types de lymphocytes T sont susceptibles d'être infectés et que le tropisme différentiel observé est due à des proliférations distinctes des différents types de lymphocytes sous l'influence de HTLV-1 ou de HTLV-2 (Kannian et al., 2012).

Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques



#### Figure 5 : Mécanismes d'attachement et d'entrée de HTLV-1 et HTLV-2

(A) L'entrée de HTLV-1 dans une cellule cible se fait via l'interaction de la protéine de surface gp46 avec des protéoglycanes à héparanes sulfate (HSPG). Cette première interaction permet de concentrer les particules virales à la surface de la cellule et facilitent l'interaction de la gp46 avec un premier récepteur, la neuropiline-1. Suit un changement de conformation de la gp46 qui entre en contact avec un second récepteur, Glut-1. Cette dernière interaction facilite la fusion. (B) HTLV-2 n'est pas dépendant des HSPG mais interagit avec les récepteurs neuropiline-1 et Glut-1.

• Les particularités de la transmission de HTLV-1 et HTLV-2 d'une cellule infectée à une cellule cible

Peu après la découverte des virus HTLV-1 et HTLV-2, il est constaté que des individus recevant les composants cellulaires de sang de donneurs infectés sont souvent à leur tour infectés par les virus contrairement à des individus recevant uniquement le plasma de donneurs infectés (Miyamoto et al., 1984). Une étude a comparé la transmission du VIH-1, de HTLV-1 et HTLV-2 suite à des transfusions de plasma. Tandis que 89% des individus recevant du plasma de donneurs infectés par le VIH-1 deviennent eux-mêmes infectés, aucune séroconversion n'est observée chez des individus recevant une transfusion de plasma de donneurs infectés par HTLV-1 ou HTLV-2 (Donegan et al., 1994). En effet, il n'est pas possible de détecter des virions par RT-PCR dans des sérums d'individus infectés par HTLV. De plus, des expériences in vitro ont montré que le virion libre était très peu infectieux. Une étude de Mazurov en 2010 montre que l'infection par HTLV-1 suite à un contact cellule-cellule est 10 000 fois plus efficace que l'infection par du virus libre contrairement à 2 fois plus pour le VIH-1 (Mazurov et al., 2010). Ces observations suggèrent que la transmission de HTLV-1 et HTLV-2 nécessite un contact entre une cellule infectée et une cellule cible. Trois modes de transmission par contact cellule-cellule ont depuis été décrits pour HTLV-1 : la synapse virologique entre cellule infectée-cellule cible (Figure 6.A), l'émission de conduits cellulaires formant un réseau entre lymphocytes infectés et lymphocytes cibles (Figure 6.B) ou la formation d'un biofilm viral à la surface des lymphocytes infectés (Figure 6.C).

La synapse virologique, à l'image de la synapse neurologique ou immunologique, est un contact étroit entre la cellule infectée et la cellule cible favorisant la transmission du virus de l'une à l'autre. Les protéines virales Gag et Env et l'ARN génomique sont concentrés au niveau du contact entre les deux cellules ce qui facilite la synthèse de particules virales à ce niveau (Igakura *et al.*, 2003). La protéine virale Tax1 est impliquée dans la mise en place de la synapse. Tax1, mais aussi Tax2, en augmentant l'expression de la protéine Gem, stimule la migration des lymphocytes infectés et la formation de conjugués entre cellules infectées et non infectées (Chevalier *et al.*, 2014, Annexe 1). Tax1 participe à la réorganisation du centre organisateur des microtubules dans la cellule infectée en direction de la synapse (Nejmedinne *et al.*, 2009). Par ailleurs, Tax1 induit l'expression de la protéine transmembranaire ICAM-1 dans la cellule infectée, qui interagit avec la protéine transmembranaire LFA-1 de la cellule cible, stabilisant ainsi le contact entre les deux cellules (Barnard *et al.*, 2005).



## Figure 6 : Les spécificités de la transmission de HTLV-1 d'une cellule infectée à une cellule cible

La transmission de HTLV-1 d'une cellule infectée à une cellule cible nécessite un contact cellulecellule. Trois modes de transmission ont été décrit pour HTLV-1 : (A) la mise en place d'une synapse virale, (B) l'émission de conduits cellulaires, (C) la formation d'un biofilm viral.

#### Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

Un autre type de contact entre une cellule infectée et une cellule cible autorisant la transmission de HTLV-1 a été observé en microscopie électronique à transmission. La cellule infectée émet des expansions formant ainsi un réseau entre lymphocytes infectés et non infectés. La protéine virale p8 augmente le nombre et la longueur de ces expansions (Van prooyen *et al.*, 2010).

Le dernier mode de transmission du virus HTLV-1 consiste en la formation d'une structure qui concentre des particules virales matures associées à des composants de la matrice extracellulaire à la surface d'un lymphocyte infecté. Cette structure est appelée biofilm viral à l'image des biofilms bactériens. Lors d'un contact avec une cellule cible, le biofilm du lymphocyte infecté assure une transmission rapide du virus à la cellule non infectée (Pais Correia *et al.*, 2010).

Alors que l'infection d'un lymphocyte par HTLV-1 nécessite un contact cellulecellule, l'étude de Jones démontre que des cellules dendritiques dérivées de monocytes mais aussi des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes primaires sont capables de capter des particules virales libres. Les cellules dendritiques transmettent ensuite les virions captés ou des virus nouvellement produits suite à une infection productive à des lymphocytes par contact cellule-cellule (Jones et al., 2008). Récemment Jones a montré que l'infection des cellules dendritiques par du virus HTLV-1 libre se faisait par macropinocytose, un type d'endocytose non spécifique. La macropinocytose est un processus constitutif dans les cellules dendritiques alors qu'il nécessite d'être induit dans les lymphocytes, ce qui expliquerait que les lymphocytes ne soient pas infectés par du virus libre (Jones et al., 2014 présentation orale au congrès HTLV Montréal). Par ailleurs différentes études montrent que les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes de patients sont infectées (Macatonia et al., 1992, Hishizawa et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes pourraient jouer un rôle important dans la propagation du virus HTLV-1 dans l'organisme suite à l'infection. Les cellules dendritiques capteraient le virus au niveau des muqueuses lors de l'infection, migreraient dans le reste de l'organisme et transmettraient le virus aux lymphocytes T par contact cellule-cellule (pour revue : Pique et Jones, 2012).

Ces différents modes de transmission n'ont pas été recherchés pour HTLV-2.

## • Les spécificités de la persistance de HTLV-1 et HTLV-2 au sein d'un individu infecté

Contrairement au VIH, très peu de particules virales de HTLV-1 et HTLV-2 libres sont détectées dans le plasma de patients infectés. De plus, très peu de variation est observée dans la séquence des génomes de HTLV-1 et HTLV-2 intégrés dans des cellules distinctes au sein d'un même individu. HTLV-1 et HTLV-2 persistent donc différemment du VIH-1 au sein d'un même individu. En effet, des études montrent que HTLV-1 et HTLV-2 se répliquent principalement via la prolifération des cellules infectées. Ainsi ce sont les polymérases cellulaires, qui font environ 10<sup>6</sup> fois moins d'erreurs que les transcriptases inverses virales, qui répliquent les génomes viraux avant la division de la cellule mère infectée en deux cellules filles infectées (Wattel *et al.*, 1995, Cimarelli *et al.*, 1996, pour revue : Mortreux *et al.*, 2003). On parle d'expansion clonale car on retrouve dans le sang périphérique d'un patient infecté différents clones, c'est à dire différents groupes de plusieurs cellules présentant le même site d'intégration du virus.

Récemment une technique a été mise au point pour calculer le nombre et la taille de chaque clone. Chez des individus asymptomatiques infectés par le virus HTLV-1, on compte des milliers de clones distincts. Ces clones sont maintenus plusieurs années. Alors que le provirus s'intègre préférentiellement à proximité de régions fortement transcrites, les clones de plus forte abondance sont ceux situés dans des régions peu transcrites. Ceci suggère une contre-sélection des clones où le provirus est intégré au niveau de régions fortement transcrites, probablement du fait de la réponse immunitaire de l'hôte (Gillet *et al.*, 2011). Une étude montre *in vivo* que BLV, l'homologue bovin de HTLV, s'insère également préférentiellement dans des régions fortement transcrites lors de la primo-infection (Gillet *et al.*, 2013). La majorité des clones générés lors de la primo-infection par BLV est ensuite déplétée, confirmant une contre-sélection probablement du fait de la réponse immunitaire de l'hôte. Les clones les plus susceptibles à la déplétion sont notamment ceux où le provirus est intégré au niveau des régions fortement transcrites (Gillet *et al.*, 2013).

Une forte réponse cytotoxique, pouvant être à l'origine de la déplétion des clones de cellules infectées, est présente chez les individus infectés par HTLV-1. Des lymphocytes cytotoxiques dirigés contre Tax sont détectés chez des patients infectés par HTLV-1 et induisent la lyse de cellules infectées *in vitro* (Jacobson *et al.*, 1990, Kannagi *et al.* 1992). Ex *vivo* les lymphocytes T cytotoxiques isolés de patients induisent la diminution du nombre de cellules infectées exprimant Tax isolées des mêmes patients. De plus, une corrélation négative existe entre la charge provirale et l'activité antivirale *ex vivo* des lymphocytes T cytotoxiques chez les patients infectés (Asquith *et al.*, 2005). De


# Figure 7 : Répartition des clones de cellules infectées chez des patients infectés par HTLV-1 ou par HTLV-2

Cette figure représente différents patrons caractéristiques de la répartition des clones chez des patients infectés par HTLV-1 ou par HTLV-2, sans maladie maligne. Chaque part de cercle correspond à un clone de cellules infectées. La surface de la part de cercle est proportionnelle à l'abondance relative du clone. Les patients infectés par HTLV-1 ont un plus grand nombre de clones mais de plus faible abondance que les patients infectés par HTLV-2. (Modifié d'après Melamed *et al.*, 2014)

#### Introduction II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

même, la présence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de HBZ est associée à une charge provirale faible (Macnamara *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que la réponse cytotoxique exerce une pression de sélection négative sur les cellules infectées. En effet, les cellules infectées exprimant Tax font partie des clones de faible proportion (Melamed *et al.*, 2013). L'implication de la réponse cytotoxique dans le développement des pathologies associées à HTLV-1 sera présentée dans la partie III.

L'environnement génomique des sites d'intégration de HTLV-2 est similaire à celui de HTLV-1. Cependant la distribution des clones parmi les lymphocytes T CD8+ infectés par HTLV-2 diffère de celle des lymphocytes T CD4+ infectés par HTLV-1. En contraste de HTLV-1, les patients infectés par HTLV-2 ont un nombre plus faible de clones mais de forte abondance (Figure 7). La médiane du nombre de clones dans le sang d'individus infectés par HTLV-1 est de 31 710 contre 976 pour les individus infectés par HTLV-2 (Melamed et al., 2014). Les forces sélectives favorisant la prolifération de certains clones plutôt que d'autres semblent différentes entre les individus infectés par HTLV-1 et HTLV-2. Nous avons évoqué qu'une forte réponse cytotoxique anti-Tax1 réprime la prolifération des clones exprimant Tax1. Des individus infectés par HTLV-2 présentent de la même façon un nombre élevé de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les cellules exprimant Tax2 (Oliveira et al., 2009). Peut-être que la réponse cytotoxique des patients infectés par HTLV-2 contrôle moins efficacement la prolifération des clones que la réponse cytotoxique des patients infectés par HTLV-1. Les auteurs suggèrent qu'un mécanisme encore non identifié pourrait favoriser la prolifération des clones infectés par HTLV-2 (Melamed et al., 2014).

# 5. HTLV-1 et HTLV-2, des répartitions géographiques actuelles distinctes

Les virus HTLV-1 et HTLV-2 présentent des répartitions hétérogènes (Figure 8). Le virus HTLV-1 est présent dans le sud-ouest du Japon, en Afrique sub-saharienne, en Amérique du sud, dans la région des caraïbes et dans des régions restreintes du Moyen-Orient, d'Australie et de Mélanésie. La transmission du virus HTLV-1 se fait selon trois modes différents : par l'allaitement de la mère à l'enfant, par voie sexuelle ou bien par voie sanguine. On estime que 10 à 25 % des nouveau-nés allaités par une mère infectée deviennent infectés par le virus. Le risque augmente avec la durée de la période d'allaitement (pour revue : De thé *et* Bomford, 1993).

En 1993, une équipe publie une estimation du nombre de personnes infectées par le virus HTLV-1. Cette étude estime qu'entre 10 et 20 millions d'individus sont infectés dans le monde (pour revue : De thé *et* Bomford, 1993). Récemment la répartition du virus HTLV-1 et sa prévalence ont été mises à jour (pour revue : Gessain *et* Cassar, 2012).

#### Introduction

#### II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

Cette étude se base sur tous les articles publiés sur le sujet, les chapitres de livres traitant de l'épidémiologie de HTLV-1 ainsi que les résumés des congrès internationaux sur HTLV et les virus associés tenus depuis 1985. Ainsi, Gessain et Cassar donnent une nouvelle estimation du nombre d'individus infectés par HTLV-1 : celui-ci varierait entre 5 et 10 millions de personnes. Cependant cette étude souligne la difficulté d'établir une telle estimation. D'une part, les méthodes permettant de diagnostiquer une infection par le virus n'ont pas toujours été très spécifiques, notamment dans les années 1980-1990. D'autre part, l'infection par le virus HTLV-1 n'est pas étudiée dans certaines régions du monde comme dans le nord et l'est de l'Afrique. De plus, les études sont basées sur des données obtenues parmi des populations précises comme les femmes enceintes, les donneurs de sang et les personnes hospitalisées ce qui peut induire un biais dans l'estimation. Celle-ci est d'autant plus biaisée du fait de la distribution hétérogène du virus, avec des foyers de très forte endémicité jouxtant des aires de très faible occurrence (pour revue : Gessain *et* Cassar, 2012).

Le virus HTLV-2 est réparti différemment de HTLV-1 (Figure 8), (pour revue : Roucoux et Murphy, 2004). Il a été d'abord identifié à l'état endémique parmi des groupes ethniques isolés comme les Amérindiens Guaymi au Venezuela ou encore chez certaines tribus d'Argentine, du Venezuela et du Brésil ainsi que parmi des populations d'Indiens de Floride et au Nouveau-Mexique. Ainsi on pensait que HTLV-2 était spécifique du Nouveau Monde, ce qui fut remis en cause lors de l'identification du virus parmi des groupes ethniques en Afrique, comme les Pygmées du Cameroun, au Gabon, en République centrafricaine et en République démocratique du Congo. Dans ces populations où le virus est endémique, le virus se transmet essentiellement lors de rapports sexuels ou de la mère à l'enfant par l'allaitement. HTLV-2 est présent également parmi les populations de toxicomanes utilisant des drogues par voie intraveineuse notamment au Brésil, aux Etats-Unis, en Italie, en Irlande, en Suède, en Espagne et au Vietnam. Dans ce cas la transmission se fait par voie sanguine via l'usage de seringues contaminées. Le nombre d'individus infectés par le virus HTLV-2 est estimé à quelques millions dans le monde (pour revue : Roucoux *et* Murphy, 2004).



## Figure 8 : Répartition géographique de HTLV-1 et HTLV-2

Selon les dernières estimations, HTLV-1 infecte 5 à 10 millions de personnes dans le monde avec des foyers de forte endémicité comme le sud-ouest du Japon, l'Afrique subsaharienne, l'Amérique du Sud, les caraïbes, Mélanésie et quelques rares cas en Europe et au Moyen-Orient. L'aire du cercle est relative au nombre d'individus infectés dans la région concernée. HTLV-2 infecte des tribus en Afrique centrale, Amérique centrale et Amérique du Sud. HTLV-2 est présent également de façon épidémique en Amérique du Nord, Amérique du Sud et en Europe. (Modifié d'après Gessain *et* Cassar, 2012, Slattery *et al.*, 1999)

# 6. HTLV-1 et HTLV-2, des histoires évolutives différentes

L'histoire évolutive d'un virus, de son origine à sa dispersion au sein des populations, peut être parfois retracée. La diversité génétique du virus est estimée en comparant les variations de séquences nucléotidiques des génomes de virus ayant des origines différentes : différentes espèces hôtes ou différentes populations. Des arbres phylogénétiques, décrivant les relations entre les différentes souches virales, sont construits à partir des variations de séquences et aident à décrypter l'histoire et l'évolution d'un virus.



## Figure 9 : Origine et évolution de HTLV-1

Le sous-type A de HTLV-1 est appelé sous-type cosmopolite : il est présent au Japon, en Amérique, en Afrique et en Europe. Le sous-type B est majoritaire en Afrique et le sous-type C en Mélanésie. Les sous-types D, E et F sont présents en Afrique mais infectent une plus faible proportion de la population que le sous-type B. Une transmission de virus du Singe à l'Homme en Asie avant le peuplement de la Mélanésie et de l'Australie à partir de l'Asie il y a 60 000 ans serait à l'origine du sous-type C. De même les sous-types A, B, D, E et F feraient suite à des transmissions du Singe à l'Homme en Afrique. La répartition mondiale du sous-type A serait la conséquence de migrations récentes de populations.

# • HTLV-1, différents épisodes de transmissions Singe-Homme et de migrations de populations

Le génome de HTLV-1 a été séquencé pour la première fois en 1983 à partir d'un patient atteint de leucémie à cellules T de l'adulte (Seiki *et al.*, 1983). D'autres séquences sont ensuite obtenues à partir du sang de divers patients. La comparaison de ces souches montre une très faible variabilité de séquences nucléotidiques. Cette très grande stabilité génétique entre les différentes souches de HTLV-1 (donc entre individus n'ayant jamais eu aucun contact) est étonnante par rapport aux autres rétrovirus. En effet les autres rétrovirus montrent une forte variabilité du fait de la faible fidélité de la transcriptase inverse par comparaison aux polymérases cellulaires. Comme précédemment évoqué, HTLV-1 utilise peu la transcriptase inverse et se réplique grâce à la prolifération des cellules infectées (Mansky, 2000).

Malgré la faible variabilité génétique entre les souches de HTLV-1, une étude démontre qu'il y a plus de similitudes de séquences entre des souches de même origine géographique qu'entre des souches de provenances distinctes mais isolées de patients souffrant de la même maladie (Komurian *et al.*, 1991). Différents variants moléculaires, appelés sous-types, ont pu être définis, notamment en comparant les séquences des LTR ou du gène *env*. On en compte actuellement 6, allant du sous-type A au sous-type F (Figure 9).

Le sous-type A, premier sous-type décrit, est aussi appelé sous-type cosmopolite. Il est présent dans de nombreuses régions du monde. C'est le sous-type majoritaire au Japon, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, dans les Caraïbes, en Europe notamment en Roumanie et au Moyen-Orient. Malgré la large répartition géographique du sous-type A, les souches appartenant à ce sous-type présentent une très faible variabilité entre elles. Le sous-type B est présent en Afrique centrale. Les souches de ce sous-type ont une variabilité plus forte entre elles que celles du sous-type A et correspondent à des régions d'Afrique centrale différentes (République démocratique du Congo, Cameroun, Gabbon). Le sous-type C est présent en Mélanésie et en Australie. C'est celui qui diffère le plus du sous-type A. Une forte variabilité entre les souches à l'intérieur du sous-type a été démontrée. Le sous-type D, comme le B, est présent en Afrique centrale notamment chez les Pygmées. Il est cependant moins fréquent que le sous-type B qui reste majoritaire dans cette région. Le sous-type E a été identifié au Gabon et le F en République démocratique du Congo. (pour revues : Slattery *et al.*, 1999, Gessain *et* Mahieux, 2000, Gessain *et* Cassar, 2012)

Par ailleurs, des souches de l'équivalent simien de HTLV-1, STLV-1 ont été séquencées et comparées entre elles et avec les sous-types d'HTLV-1 (Watanabe *et al.*,

#### Introduction

#### II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

1986). Ainsi il a été montré qu'il y avait une plus forte homologie entre des souches simiennes africaines avec le sous-type humain B qu'avec une souche simienne d'Asie. Il existe donc aussi une diversité de souches simiennes. Plus de 50 souches de STLV-1 ont été reportées en Afrique, en Asie chez de nombreuses espèces de singes (Babouins, Chimpanzée commun, Singe vert, Mandrill, Orang-outan). Cependant, ce virus n'a jamais été décrit sur le continent américain. Des virus isolés chez des singes de même origine géographique mais d'espèces différentes montrent une plus grande homologie que des virus séquencés chez des individus de la même espèce mais géographiquement séparés ce qui démontre l'existence de transmissions inter-espèces entre singes proches géographiquement (Mahieux *et al.*, 1998, pour revue : Gessain *et* Mahieux, 2000). Par ailleurs, la forte homologie entre des souches simiennes et humaines dans des mêmes régions d'Afrique suggère que le virus se transmission du Singe à l'Homme (pour revue : Gessain *et* Mahieux, 2000). La transmission du Singe à l'Homme nécessite un contact sang-sang qui peut avoir lieu lors de morsures profondes par un animal blessé lors de séances de chasse ou par un animal maintenu en captivité.

La répartition actuelle des virus HTLV-1 et STLV-1 résulte donc de différents événements : la transmission du virus STLV-1 entre différentes espèces de singes, différents épisodes de transmission du virus du Singe à l'Homme en Afrique et en Asie aboutissant au sous-type C en Mélanésie et aux sous-types B, D, E et F en Afrique. La répartition du sous-type A à travers le monde ferait suite à des épisodes de migration de population, comme la traite des esclaves, amenant ainsi le virus aux Amériques et aux Caraïbes. L'origine du virus HTLV-1 au Japon reste encore mystérieuse et résulterait peut être de migrations mal identifiées de populations infectées par le virus (Figure 9), (pour revues : Slattery *et al.*, 1999, Gessain *et* Mahieux, 2000, Gessain *et* Cassar, 2012)

#### • Origine et évolution de HTLV-2, une histoire plus complexe

Il existe 4 sous-types de HTLV-2 identifiés (Figure 10) : HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c et HTLV-2d. HTLV-2a et HTLV-2b sont présents en Amérique du nord, Amérique du sud et Europe avec quelques rares cas en Asie et en Afrique. HTLV-2a est identifié chez les populations de toxicomanes d'Amérique du Nord, d'Irlande et de Suède. HTLV-2b est caractéristique des populations amérindiennes, et des toxicomanes d'Italie et d'Espagne. (Hall *et al.*, 1992). HTLV-2c, finalement considéré comme un sous-groupe du sous-type a, a été identifié parmi des indigènes vivant dans la région de l'Amazone au Brésil (Eiraku *et al.*, 1996) et HTLV-2d chez une tribu de Pygmée vivants en Afrique centrale (Vandamme *et al.*, 1998).



## Figure 10 : Origine et évolution de HTLV-2

HTLV-2 est représenté par 4 sous-types. HTLV-2b et 2d sont présents de façon endémique dans des tribus en Afrique. HTLV-2a, 2b et 2c sont trouvés parmi les populations endémiques en Amérique du Nord et Amérique du Sud. HTLV-2a et 2b se répandent de façon épidémique chez les drogués par voie intraveineuse. STLV-2 et HTLV-2 auraient divergés il y a environ 400 000 ans en Afrique. HTLV-2 se serait ensuite transmis sur le continent américain suite aux migrations de populations peuplant l'Amérique à partir de l'Asie de 35 000 à 15 000. HTLV-2a et 2b auraient divergé au cours de l'exode de l'Afrique et du peuplement de l'Amérique. Cependant, aucun individu infecté par le virus n'a été détecté en Asie. Plus récemment, une épidémie HTLV-2a et 2b sévit au sein des populations de drogués par voie intraveineuse principalement en Amérique du Nord et en Europe.

#### Introduction

#### II. HTLV-1 et HTLV-2, des similitudes moléculaires aux différences épidémiologiques

Un virus simien apparenté mais différent d'HTLV-2 a été identifié en République démocratique du Congo chez des bonobos. Contrairement aux sous-types de HTLV-1 qui ont de très fortes homologies avec des souches simiennes, permettant ainsi de supposer que le virus s'est transmis du Singe à l'Homme, les souches de STLV-2 montrent une plus forte divergence vis-à-vis des virus HTLV-2 (Van Brussel et al., 1998). Ainsi il n'est pas possible de savoir si le virus a initialement infecté le Bonobo et s'est transmis du Singe à l'Homme ou si un ancêtre commun infectant à la fois le Bonobo et l'Homme a évolué différemment en fonction de l'hôte. Le sous-type HTLV-2d, présent en Afrique, est le plus divergent vis-à-vis des autres sous-types, et le plus proche des souches de STLV-2 suggérant une origine africaine du virus (Vandamme *et al.*, 1998). La migration à partir de l'Afrique aurait aboutit à l'émergence des sous-types a et b. Le virus aurait été introduit sur le continent américain au début de son peuplement, au cours de migrations de populations à partir d'Asie via le détroit de Beiring y a 35 000 à 15 000 ans (Neel et al., 1994). Cependant aucun individu infecté par HTLV-2 n'a été détecté en Asie. Le virus se serait transmis récemment au sein des populations de toxicomanes utilisant des drogues par voie intraveineuse en Amérique et répandu via l'utilisation de seringues contaminées (Figure 10), (Biggar et al., 1996). De façon étonnante des souches isolées chez des Pygmées en Afrique et des tribus en Amérique sont quasi-identiques et montrent plus d'homologies que des souches isolées chez des toxicomanes originaires de la même région. Il a été montré que le taux d'évolution du virus est 150 à 350 fois plus rapide au sein des populations de toxicomanes par voie intraveineuse que parmi les individus infectés de façon endémique (Vandamme et al., 2000, Gabet et al., 2006). Ce rapide taux d'évolution pourrait être du à une transmission du virus essentiellement par voie sanguine d'une part et d'autre part à la co-infection avec le VIH qui est souvent observée chez cette population et qui pourrait favoriser la réplication de HTLV-2 (pour revue : Vandamme et al., 2000).

La divergence entre HTLV-2 et son équivalent simien STLV-2 est datée à environ 400 000 ans tandis que la divergence entre HTLV-1 et STLV-1 est plus récente et est datée à 93 000 ans environ (pour revue : Vandamme *et al.*, 2000). HTLV-1 et HTLV-2 ont une origine africaine commune mais des histoires évolutives très différentes.

# III. Pathologies associées à HTLV-1 et HTLV-2 : HTLV-1 un virus oncogène, HTLV-2 un virus n'induisant pas de leucémie

HTLV-1 induit des pathologies chez 2 à 5 % des individus infectés (Figure 11.A). Les deux principales maladies induites par HTLV-1 sont la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) décrite dans la partie III.1 (pour revue : lwanaga *et al.*, 2012) et la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie induite par HTLV-1 (HAM/TSP) décrite dans la partie III.2 (pour revue : Yamano *et* Sato, 2012). HTLV-2 contrairement à HTLV-1 ne provoque pas de leucémie (figure 11.B) et de façon générale, est moins pathogène que HTLV-1 (pour revue : Roucoux *et* Murphy, 2004).





HTLV-1 (A.) est principalement à l'origine de deux maladies : la leucémie à cellules T de l'adute (ATL), (2 à 7% des individus infectés) et la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (HAM/TSP), (2 à 3% des individus infectés). HTLV-2 (B.) est moins pathogène que HTLV-1 et n'induit pas de leucémie.

# 1. La leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) causée par HTLV-1

# • L'ATL, une maladie rare mais agressive

La leucémie à cellules T de l'adulte (ou ATL "Adult T cell Leukemia") a été décrite initialement au Japon en 1977 (voir partie I.2). Elle se déclenche principalement chez l'adulte au minimum 20 à 30 ans après la primo-infection (Shimoyama, 1991, pour revue : Iwanaga *et al.*, 2012). Plusieurs études montrent que les patients développant cette maladie sont infectés dès leur plus jeune âge, lors de l'allaitement (Kajiyama *et al.*, 1986, pour revue : Moriuchi *et al.*, 2013). Le risque de développer l'ATL au cours de la vie d'un individu infecté par HTLV-1 est de 6 à 7% pour les hommes et 2 à 3% pour les femmes (Figures 11.A et 12), (pour revue : Iwanaga *et al.*, 2012). Au Japon, sur environ 1 million d'individus infectés par HTLV-1, 1000 nouveaux cas d'ATL sont diagnostiqués chaque année et 1000 personnes meurent de la maladie par an. Au Brésil, 30% des leucémies à cellules T sont des ATL.



# Figure 12 : Clonalité chez un patient infecté par HTLV-1 et développant une ATL

L'abondance de clones de cellules infectées par HTLV-1 chez un patient est mesurée avant et après le développement d'une ATL aiguë. Chaque portion du cercle représente un clone de cellules infectées ; la surface du cercle occupée par un clone est proportionnelle à son abondance relative. (Modifié à partir de Bangham *et al.*, 2013)

L'ATL est associée à une charge provirale élevée (Manns *et al.*, 1999, lwanaga *et al.*, 2010) et se caractérise par une prolifération maligne et clonale des lymphocytes T CD4+ infectés (Figure 11.A et Figure 12). Ainsi chez les patients ATL, un clone ou un faible nombre de clones de cellules infectées est dominant sur les autres. L'expansion est alors dite monoclonale. L'abondance des clones présents chez une personne infectée et asymptomatique puis ayant développé une ATL un an plus tard a été mesurée. De façon intéressante, le clone de cellules infectées dominant au stade ATL ne fait pas partie des clones majoritaires au stade asymptomatique (Figure 12), (pour revue : Bangham *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que tout clone de cellules infectées peut être susceptible de proliférer de manière non contrôlée et être à l'origine de la maladie.

On compte quatre formes cliniques de la maladie (Shimoyama et al., 1991, pour revue : Verdonck et al., 2007) : progressive, chronique, lymphomateuse aiguë ou leucémique aiguë. La forme progressive se caractérise par un taux de moins de 5% de cellules leucémiques dans le sang périphérique contre plus de 5% pour la forme chronique. La forme lymphomateuse se caractérise par une augmentation de volume des ganglions lymphatiques sans présence de cellules leucémiques dans le sang. La forme aiguë leucémique est la plus courante (46,7% des ATL) et la plus agressive avec un nombre important de cellules leucémiques dans le sang, et une adénopathie généralisée très souvent accompagnée d'une hépatosplénomégalie. Ces patients développent une hypercalcémie, c'est à dire une hausse de calcium dans le sang due à des lésions des os. En effet, les cellules leucémiques induiraient la différentiation des cellules hématopoïétiques en ostéoclastes responsables de la résorption osseuse (pour revue : Taylor et Matsuoka, 2005). La médiane de survie des patients est de 6 mois pour la forme leucémique aiguë et 10 mois pour la forme lymphomateuse (Shimoyama et al., 1991, pour revue : Verdonck et al., 2007). Les patients atteints des formes progressive et chronique ont une plus longue médiane de survie. Cependant la maladie peut évoluer d'un stade progressive ou chronique vers une forme aiguë.

Fonctions	Protéines interagissant avec Tax	
Voies de signalisation cellulaires, Transcription (Modulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de l'expression virale)	<b>voie NF-KB :</b> IKKα, IKKβ, IKKγ/NEMO, IkBα,IkBγ RelA, p100, p50 TAK, TRAF6, NRP/optineurin USP20, TAX1BP1	
	<b>Voie des MAP kinases :</b> MEKK1, TAK1	
	<b>Voie TGF-β:</b> Smad2, Smad3, Smad4	
	<b>Voie SRF :</b> SRF, Elk-1, SAP-1	
	<b>Voie PI3K/Akt/AP-1 :</b> p85α (sous-unité régulatrice de PI3K)	
	Facteurs de transcription ATF/CREB : CREB, CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4, XBP-1 TORC-1, TORC-2, TORC-3 (co-activateurs de CREB)	
	Autres facteurs de transcription : TF <sub>II</sub> A, TF <sub>II</sub> D	
	<b>SW1/SNF</b> (complexe de remodelage des nucléosomes) : PBAF	
	Modification des histones : CBP/p300, pCAF (Histones désacétylases) HDAC1 (Histones désacétylases) CARM1/SMYD3 (méthyltransférases)	
Cycle cellulaire	<b>Cycline et Kinases dépendantes de cyclines :</b> Cycline D1, D2, D3 CDK6 CDK4	
	Rb	
	Inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines : CDKN2A, CDKN2B	
	Réparation de l'ADN (voie ATM et ATR) : ATM, CHK1, CHK2	
	Cohésion-Duplication des centrosomes RanBP1, Tax1BP2	
	Fuseau mitotique : Mad2, CDC20	
Suppresseurs de tumeurs	MAGI-1, Scribble, hGlg	

**Tableau 2 : Exemples de protéines interagissant avec Tax** (modifié à partir de la revue de Boxus *et al.*, 2008)

## • L'ATL, rôle de la protéine Tax dans la transformation cellulaire

Les cellules ATL ont des spécificités communes à l'ensemble des cellules cancéreuses : une accumulation d'anomalies génétiques, une sous-expression des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, une sur-expression des gènes impliqués dans l'activation du cycle cellulaire et la prolifération, une résistance à l'apoptose ou encore une capacité de migration accrue (pour revue : Yamagishi *et* Watanabe, 2012). Par exemple, les cellules ATL se caractérisent par un nombre anormal de chromosomes surtout chez les patients atteints des formes les plus agressives, des délétions chromosomiques touchant notamment le gène codant le régulateur du cycle cellulaire CDKN2A, des mutations du gène suppresseur de tumeur p53 dans 26 à 40% des cas, pourcentage cependant plus faible que pour la plupart des autres cancers, une surexpression de chemokines et de cytokines comme l'interleukine-1, l'interleukine-2 ou le TNF- $\alpha$  ainsi que de leurs récepteurs comme le récepteur à l'interleukine-2 ou le récepteur aux chemokines CCR4.

Le virus HTLV-1 est donc un virus oncogène c'est à dire qu'il est capable de transformer la cellule qu'il infecte. Contrairement aux virus oncogènes animaux comme le virus du sarcome de Rous ou le virus de la leucémie aviaire, le génome de HTLV-1 ne code pas pour l'homologue d'un oncogène cellulaire qui induirait la prolifération des cellules infectées, et il n'induit pas de mutagenèse insertionnelle c'est à dire qu'il ne s'insère pas préférentiellement en amont d'un gène codant un oncogène. Mais il code pour une protéine virale oncogène : Tax. Ainsi, Tax est capable d'immortaliser des lymphocytes primaires humains CD4+ in vitro (Grassmann et al., 1992). De plus, l'expression transgénique de Tax dans les thymocytes en voie de développement chez la souris induit le développement de lymphomes, de leucémies et d'infections opportunistes similaires aux patients ATL (Hasegawa et al., 2006). Tax interagit avec des centaines de protéines cellulaires (Tableau 2). De nombreuses études ont donc cherché à déterminer comment Tax transformait les cellules via ces interactions. Ceci n'étant pas le sujet de mon travail de thèse, l'ai choisi de résumer brièvement l'ensemble de ces processus ci-dessous (Figure 13).



Figure 13 : Fonctions pléiotropiques de Tax

En vert sont représentées les fonctions ou les protéines activées par Tax, en rouge les fonctions ou les protéines inhibées par Tax. Ces fonctions sont à l'origine de la réplication virale, la survie cellulaire, l'instabilité génétique et la prolifération cellulaire.

Tax dérégule diverses voies de signalisation comme la voie NF- $\kappa$ B impliquée dans la régulation de la vie et de la mort cellulaire. Via l'activation constitutive des voies classique et alterne de NF- $\kappa$ B, Tax stimule l'expression de nombreux facteurs de croissance comme l'interleukine-2 et de leurs récepteurs. Tax active l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-xl et réprime celle de facteurs apoptotiques comme la caspase 8 (Pise-Masison *et al.*, 2002). Tax favorise la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire : par exemple Tax inhibe les points de contrôle du cycle cellulaire comme le point de contrôle G1/S. Tax est ainsi impliquée dans la prolifération non contrôlée des cellules infectées et est responsable de l'accumulation de dommages à l'ADN. (pour revues : Boxus *et* Willems, 2009, Marriott *et* Semmes, 2005, Matsuoka *et al.*, 2007, Romanelli *et al.*, 2013).

# • L'ATL, rôle de l'ARNm et de la protéine HBZ dans la prolifération cellulaire et le processus leucémogène

Alors que Tax est directement impliquée dans la transformation cellulaire, l'expression de l'ARNm de Tax n'est détectée que dans 40% des cellules issues de patients ATL. Dans de nombreux cas, des mutations non-sens, des insertions ou des délétions affectent la séquence de Tax. Par ailleurs, des méthylations de l'ADN et des

délétions au niveau du LTR 5' répriment l'expression du provirus. Contrairement à l'expression de Tax, l'expression de HBZ, dont l'ARNm est transcrit à partir du LTR 3', est détectée dans toutes les cellules ATL. De plus, HBZ inhibe l'interaction de Tax avec CREB et empêche le recrutement des histones acétyltransférases CBP et p300 au niveau du LTR 5'. En conséquence HBZ inhibe indirectement l'expression des autres gènes viraux (Lemasson *et al.*, 2007). Le fait que HBZ soit exprimée dans toutes les cellules ATL alors que l'expression des autres gènes viraux est altérée pose la question du rôle de cette protéine dans le développement de la leucémie.

L'infection de cellules mononucléaires de sang périphérique par co-culture avec des cellules produisant soit du virus sauvage soit du virus mutant pour HBZ induit l'immortalisation des cellules mononucléaires infectées dans les deux cas (Arnold *et al.*, 2006). *In vitro* HBZ n'est donc pas indispensable à l'immortalisation des cellules infectées. Cependant, des lapins inoculés avec des cellules infectées par du virus mutant pour HBZ ont une charge provirale plus faible que des lapins inoculés avec des cellules infectées par du virus sauvage (Arnold *et al.*, 2006). HBZ serait donc impliquée dans le maintien de l'infection *in vivo*.

HBZ, en inhibant l'expression des autres protéines virales, permet à la cellule infectée d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Lemasson *et al.*, 2007). HBZ inhibe également l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B classique par Tax, une trop forte activation de la voie pouvant entraîner la sénescence de la cellule. Cependant, la voie NF- $\kappa$ B reste constitutivement activée dans les cellules ATL malgré l'absence de Tax. L'expression du micro-ARN miR-31, régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B, est réprimée dans les cellules ATL, ce qui peut expliquer la persistance de l'induction constitutive de la voie (Yamagishi *et al.*, 2012). La protéine HBZ active également l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase (Kuhlmann *et al.*, 2007). En maintenant la longueur des télomères, extrémités des chromosomes, la télomérase empêche les cellules infectées d'entrer en sénescence.

La transduction d'ARN interférants diminuant l'expression de HBZ dans des cellules ATL entraine une baisse de la prolifération des cellules. L'expression de HBZ stimule donc la prolifération des cellules infectées. De façon étonnante, l'ARNm de HBZ stimule la transcription du facteur E2F1 impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Satou *et al.*, 2006). Des souris transgéniques pour HBZ développent des lymphomes à cellules T CD4+ après un très long temps de latence clinique, suggérant aussi l'implication de HBZ dans le processus leucémogène. Cette même étude montre que l'expression transgénique de HBZ est associée à une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs (contrôlant l'activation des

51

lymphocytes effecteurs). Cette augmentation est spécifique de HBZ puisque des souris transgéniques pour Tax n'ont pas un nombre élevé de lymphocytes T régulateurs. Cependant les lymphocytes T régulateurs présents en nombre élevé chez les souris transgéniques pour HBZ ne sont pas fonctionnels. Les patients ATL présentent également un nombre accru de lymphocytes T régulateurs non fonctionnels. Cette étude suggère que HBZ est responsable du phénotype spécifique et de la prolifération des cellules ATL (Satou *et al.*, 2011).

#### • L'ATL, un processus multifactoriel encore mal caractérisé

La protéine Tax est impliquée dans l'infection et la transformation cellulaire tandis que HBZ participe au processus leucémogène en assurant notamment la prolifération des cellules infectées. Une seule étude (Satou *et al.*, 2011) montre de plus que HBZ induit la transformation cellulaire. Un modèle a été établi impliquant premièrement Tax puis dans un second temps HBZ dans le développement de l'ATL (Figure 14) : Tax initie la transformation des cellules infectées puis HBZ assure la prolifération des cellules transformées (pour revue : Matsuoka *et* Green, 2009).

Le fait que seulement certains clones de cellules infectées prolifèrent et sont à l'origine de l'ATL reste difficilement explicable. Nous avons évoqué dans la partie II qu'une forte réponse cytotoxique exerce une pression de sélection négative notamment sur les clones exprimant Tax. Ainsi les clones sélectionnés seraient ceux qui échappent à la forte réponse cytotoxique anti-Tax. Cependant, des études montrent que les patients ATL ont une réponse cytotoxique anti-Tax faible (pour revue : Kannagi et al., 2012), remettant en cause que ce soit la réponse cytotoxique anti-Tax qui favorise la prolifération de certains clones uniquement. Par ailleurs une étude effectuée sur plus de 400 patients infectés par HTLV-1 montrent que les individus avec des allèles HLA-I liant fortement HBZ sont asymptomatiques et ont une charge provirale faible (Macnamara et al., 2010). Ainsi l'échappement à une réponse cytotoxique anti-HBZ pourrait favoriser la prolifération de certains clones. En modulant la charge provirale, la réponse cytotoxique pourrait être impliquée dans le contrôle du développement de l'ATL. Cependant aucun donnée in vivo ne montre un lien direct entre l'efficacité de la réponse cytotoxique et le risque d'incidence de l'ATL (pour revue : Rowan et Bangham, 2012).

Des études récentes montrent que l'expression des micro-ARN, petits ARN de 22 nucléotides, est dérégulée dans les cellules infectées par HTLV-1 (pour revue : Sampey *et al.*, 2012). Par exemple miR-155 qui inhibe l'expression du facteur pro-apoptotique TP53INP1, est surexprimé tandis que miR-149 qui réprime l'expression

des histones acétyltransférases p300 et p/CAF est inhibé. Des modifications épigénétiques, c'est à dire des modifications post-traductionnelles de l'ADN ou des histones, modifiant la compaction de la chromatine et régulant la transcription des gènes, sont aussi observées dans les cellules ATL. L'expression de régulateurs du cycle cellulaire CDKN2A est par exemple réprimée via des méthylations de l'ADN (pour revue : Yamagishi et Watanabe, 2012). Ces données indiquent que des phénomènes autres que le relais Tax-HBZ entrent en jeu dans la mise en place et le maintien du processus leucémogène. Le développement de l'ATL apparaît donc comme un processus long et multifactoriel. A ce jour, le mécanisme exact du développement de la maladie suite à l'infection par HTLV-1 n'est pas encore complètement caractérisé.



#### Figure 14 : Implication des protéines Tax et HBZ dans le développement de l'ATL

Les fonctions des protéines Tax (en bleu) et HBZ (en violet) assurent la transformation et la prolifération des lymphocytes infectés et sont impliquées dans le développement de l'ATL. L'expression de Tax n'est détectée que dans 40% des cellules infectées des patients ATL contrairement au transcrit HBZ qui est détecté dans toutes les cellules. Les réponses cytotoxiques anti-Tax et anti-HBZ modulent la charge provirale. Par conséquent elles pourraient influencer le développement de l'ATL même si aucune donnée *in vivo* ne montre directement un lien entre le réponse cytotoxique et le risque d'incidence de la maladie (pour revue : Rowan *et* Bangham, 2012) ; (Modifié à partir du manuscrit de thèse d'E. Douceron)

#### • L'ATL, peu de traitements efficaces

Malgré les progrès récents en matière de traitements contre les cancers, la médiane de survie des patients avec les formes les plus graves de l'ATL ne dépasse généralement pas un an.

Une des premières rémissions complètes d'un patient ATL est obtenue en 1996 suite à une transplantation allogénique de moelle osseuse (Borg *et al.*, 1996). Deux ans après l'opération, le virus n'est pas détecté par PCR dans le sang périphérique et le patient est toujours vivant 9 ans après la transplantation. Cependant, les opérations de transplantion ultérieures montrent des résultats plus mitigés avec souvent une rechute du patient ou un décès résultant de complications (pour revue : Taylor *et* Matsuoka, 2005). Les transplantations sont actuellement limitées du fait du faible nombre de donneurs compatibles, de l'âge des patients souvent supérieur à 60 ans et de la faiblesse de leur système immunitaire due à la maladie.

Le traitement classique des patients ATL repose sur la chimiothérapie, c'est à dire l'utilisation de substances chimiques inhibant la prolifération cellulaire de façon non spécifique. Les meilleurs résultats sont obtenus par injection d'un cocktail d'environ 9 drogues : la vincristine et la vindésine, inhibiteurs de la polymérisation des microtubules, la cyclophosphamide et la ranimustine, agents ajoutant des groupements alkyles sur l'ADN, la carboplatine, qui se fixe sur l'ADN, la doxorubicine, agent intercalant et inhibiteur des topoisomérases, l'étoposide, un inhibiteur de la toposisomérase II, la prednisone, un corticostéroïde, et le GM-SCF qui permet de reconstituer un pool de neutrophiles. Ce traitement a été testé sur 96 patients, 58 atteints de la forme aiguë, 28 de la forme lymphomateuse et 10 de la forme chronique (Yamada et al., 2001). Le taux de rémission complète, c'est à dire de la disparition des tumeurs et des cellules leucémiques dans le sang pendant au moins un mois, est de 19,6% pour les patients atteints de la forme aigue, 66,7% pour ceux affectés par la forme lymphomateuse et 40% pour les individus présentant les symptômes de l'ATL chronique. La médiane de survie est de 13 mois pour l'ensemble des patients (Yamada et al., 2001). Cependant, les patients atteints de la forme leucémique aiguë de l'ATL restent très peu sensibles au traitement par chimiothérapie.

De nombreuses recherches cliniques sont menées visant à réprimer la réplication du virus, bloquer le cycle cellulaire, inhiber la voie NF-κB ou encore cibler les cellules leucémiques avec des anticorps monoclonaux dirigés par exemple contre le récepteur à l'interleukine-2 (pour revue : Bazarbachi *et al.*, 2011). Bien que la rémission complète soit obtenue pour certains patients, beaucoup de ces traitements

54

s'avèrent souvent moins efficaces que la chimiothérapie. D'autres nécessitent d'avantage d'expérimentations cliniques pour conclure sur leur efficacité.

Des thérapies dites antivirales sont également employées pour tenter de soigner les patients ATL (pour revue : Bazarbachi et al., 2011). Ces stratégies consistent à traiter les patients avec des molécules ayant une large activité antivirale comme l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) en combinaison avec l'AZT, un inhibiteur de la transcriptase inverse. L'IFN- $\alpha$  est une cytokine naturellement produite en réponse à une infection et qui induit la synthèse de nombreuses protéines dotées d'une activité antivirale. Un traitement combinant AZT et IFN- $\alpha$  semble efficace notamment chez les patients atteints de l'ATL aiguë et n'ayant pas été traités au préalable par chimiothérapie (pour revue : Bazarbachi et al., 2011). Ces résultats positifs sont confirmés par plusieurs études cliniques réalisées dans des régions distinctes du monde. Un taux de 100% de survie 5 ans post-traitement est observé pour des patients atteints des formes progressives et chroniques de la maladie. 82% des patients souffrant de la forme leucémique aiguë étaient en rémission complète 5 ans après le traitement. Bien que non utilisée au Japon, la combinaison IFN- $\alpha$  et AZT semble donner les meilleurs résultats pour traiter les patients atteints des formes progressive, chronique et leucémique aiguë. Concernant les patients atteints de la forme lymphomateuse, le taux de rémission complète et la médiane de survie sont d'avantage augmentés par chimiothérapie, notamment par la combinaison des neuf drogues employées dans l'essai clinique de Yamada (Yamada et al., 2001). Par ailleurs, des études montrent que l'IFN- $\alpha$  et l'arsenic trioxide induisent l'apoptose de cellules ATL in vitro (Bazarbachi et al., 1999, El-Sabban et al., 2000, Mahieux et al., 2001). Ainsi des essais cliniques sont réalisés en ajoutant l'arsenic trioxide à la combinaison AZT/IFN- $\alpha$  et donnent des résultats encourageants. La combinaison arsenic trioxide/AZT/IFN- $\alpha$  pourrait permettre de soigner plus durablement les patients. Ce traitement s'est révélé très efficace lors d'une étude clinique visant à soigner des patients atteints de la forme chronique (pour revue : Bazarbachi et al., 2011).

Peu de traitements sont efficaces pour soigner durablement les patients atteints de l'ATL, notamment des formes leucémique et lymphomateuse aiguës. Les traitements utilisés diffèrent en fonction des régions du monde : transplantation et chimiothérapie sont d'avantage utilisées au Japon tandis qu'en Europe et au Moyen-Orient les thérapies antivirales combinant l'IFN- $\alpha$  à l'AZT sont privilégiées.

55

# 2. Autres pathologies liées à HTLV-1

## La HAM/TSP, une pathologie inflammatoire

Peu après la découverte du virus HTLV-1 et de son association avec la leucémie à cellules T de l'adulte, une équipe met en évidence que HTLV-1 est aussi responsable de la paraparésie tropicale spastique aussi appelée désormais myélopathie associée à HTLV-1 (HAM/TSP) (Gessain *et al.*, 1985). La HAM/TSP touche 2-3% des individus infectés par HTLV-1, et se développe préférentiellement chez les femmes (pour revue : Verdonck *et al.*, 2007). Il s'agit d'une maladie neuro-dégénérative progressive aboutissant à une paraplégie irréversible des membres inférieurs. Les patients souffrent de troubles de la marche, de douleurs et contractures des membres inférieurs et de troubles sphinctériens. Les symptômes sont communs à d'autres myopathies ce qui rend le diagnostic difficile.

La maladie est associée à une inflammation de la moelle épinière. La substance blanche, située en périphérie de la moelle épinière et constituée des axones des neurones sensoriels et des motoneurones, est principalement touchée. Cette inflammation serait due à une réponse immune pro-inflammatoire excessive en réponse à une très forte charge provirale. En effet les patients HAM/TSP, comme les patients ATL, ont une charge provirale plus élevée que les individus asymptomatiques. De plus, les patients ont un fort taux lymphocytes T CD4+ circulants produisant des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) ou l'IFN- $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ). Des lymphocytes T CD4+ infectés et des lymphocytes cytotoxiques spécifiques de HTLV-1 sont présents au niveau des lésions de la moelle épinière (pour revue : Verdonck *et al.*, 2007).

Trois hypothèses sont formulées pour expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie (Araujo *et* Silva, 2006). La première consiste en une cytotoxicité directe : les cellules gliales faisant partie de l'environnement des neurones sont infectées par HTLV-1 et reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus (Figure 15.A). Cependant aucune preuve ne démontre l'infection directe des cellules gliales. La deuxième hypothèse consiste en une réponse autoimmune : les cellules gliales expriment une protéine ressemblant à un peptide de Tax et sont reconnues par les lymphocytes cytotoxiques spécifiques de Tax (Figure 15.B). Selon la troisième hypothèse les cytokines sécrétées par les lymphocytes infectés et les lymphocytes CD8+ spécifiques de HTLV-1 sont directement toxiques pour les cellules gliales (Figure 15.C).



# Figure 15 : Modèles de pathogénèse de la HAM/TSP expliquant la mort des cellules gliales

A. Modèle cytotoxique, B. Modèle de l'auto-immunité, C. Modèle bystander (Modifié d'après Araujo *et* Silva, 2006)

Ces trois hypothèses requièrent une altération de la barrière hématoencéphalique, qui sépare le système nerveux central de la circulation sanguine. Cette barrière est composée notamment de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées. *In vitro*, des lymphocytes infectés par HTLV-1 augmentent la perméabilité de cellules endothéliales de rat via la sécrétion de TNF- $\alpha$ , ce qui permet le passage de particules virales par transcytose au travers de la barrière (Romero *et al.*, 2000). Plus récemment, une étude a montré que HTLV-1 infecte les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique *in vitro* et altère l'expression des protéines constituant les jonctions serrées, augmentant ainsi la perméabilité de la barrière (Afonso *et al.*, 2008).

La HAM/TSP ne se soigne pas. Les traitements visent soit à réduire les symptômes de la maladie, soit à en diminuer les causes comme la charge provirale ou l'inflammation. Plusieurs essais cliniques visant à traiter les patients avec de l'interféron  $\alpha$  ou  $\beta$  ont donné des résultats mitigés ne permettant pas d'améliorer l'état clinique des patients durablement (Izumo *et al.*, 1996, Saito *et al.*, 2004, Oh *et al.*, 2005). Pour le moment aucun traitement n'a permis de bloquer l'évolution de la maladie à long-terme.

## • Autres pathologies induites par HTLV-1

HTLV-1 est associé à de nombreuses pathologies inflammatoires telles des uvéites (inflammations des structures internes de l'oeil), dermatites (inflammations de la peau), myosites (inflammations des muscles striés), arthrites (inflammations des articulations), (pour revue : Verdonck *et al.*, 2007).

## 3. HTLV-2, un virus pathogène ?

# • Maladies inflammatoires et respiratoires chez les patients infectés par HTLV-2

La bibliographie des pathologies liées à HTLV-2 se limite à quelques études de cas. Une quinzaine de patients infectés par HTLV-2 et atteints d'une maladie neurologique semblable à la HAM/TSP est reportée. Mais l'association entre l'infection par HTLV-2 et la HAM/TSP chez ces patients est controversée. Certains des individus sont co-infectés avec le VIH-1 ou le virus de l'hépatite C : le rôle joué par HTLV-2 seul dans le développement de la maladie est donc difficilement quantifiable. L'étude clinique de ces patients est souvent incomplète et un même patient peut être décrit par plusieurs rapports (pour revue : Araujo *et* Hall, 2004). Par ailleurs, les critères de diagnostic de la HAM/TSP chez les personnes infectées par

HTLV-2 sont imprécis et sont semblables à ceux d'autres maladies neurologiques. A titre d'exemple, une étude de cas avait décrit une HAM/TSP chez une patiente infectée par HTLV-2. Quelques années plus tard, le frère de cette patiente développait les mêmes symptômes sans être infecté par le virus (Peters *et al.*, 1999).

Une équipe a suivi une cohorte de 160 personnes infectées par HTLV-1 et de 405 individus infectés par HTLV-2 pendant plus de dix ans (Orland et al., 2003). Six cas de HAM/TSP ont été diagnostiqués pour les individus infectés par HTLV-1 contre 4 parmi les individus HTLV-2. La prévalence de la HAM/TSP liée à HTLV-2 serait donc de 1% contre 3,7% pour les individus infectés par HTLV-1. Cette étude est un argument en faveur du rôle joué par HTLV-2 dans le développement de la maladie neurologique. Cependant les patients ont généralement des symptômes moins graves évoluant moins rapidement que pour les patients infectés par HTLV-1. La charge provirale est plus faible chez les patients infectés par HTLV-2 : celle-ci est identique entre les individus infectés par HTLV-2 malades ou non, tandis que les patients infectés par HTLV-1 et atteints de la HAM/TSP ont une charge provirale 10 à 100 fois plus élevée que les porteurs asymptomatiques. Une charge provirale faible pourrait être liée à des symptômes moins graves chez les individus HTLV-2. Par ailleurs, aucune corrélation n'a été établie entre le taux d'anticorps anti-HTLV-2 présent dans le liquide céphalo-rachidien et la sévérité de la maladie alors qu'une corrélation positive est observée chez les patients HAM/TSP infectés par HTLV-1 (pour revue : Araujo et Hall, 2004). Le suivi de cette cohorte dans le futur permettra de préciser les estimations et le rôle joué par HTLV-2 dans le développement de la HAM/TSP (Orland et al., 2003).

D'autres maladies neurologiques comme des neuropathies périphériques ont été décrites chez des patients infectés par HTLV-2 (Biswas *et al.*, 2009). De la même façon que pour la HAM/TSP, le lien entre l'infection et les symptômes cliniques n'est pas prouvé clairement. Des études montrent une augmentation de la prévalence de pneumonies, bronchites, asthmes, arthrites et de maladies bactériennes comme la tuberculose chez les individus infectés par HTLV-2. L'augmentation des pathologies respiratoires chez ces patients pourrait résulter d'une inflammation ou d'une réponse auto-immune (pour revue : Roucoux *et* Murphy, 2004).

Peu de traitements ont essayé de combattre l'infection contre HTLV-2 et les éventuels symptômes cliniques associés. Une étude reporte le traitement par trithérapie (deux inhibiteurs de la transcriptase inverse, AZT et lamivudine et un inhibiteur de la protéase, indinavir) de deux patients co-infectés par VIH-1 et HTLV-2. Le traitement entraîne une hausse de la charge provirale pendant les premiers jours

59

avant que cette dernière ne diminue (Machuca *et al.*, 2001). Une étude récente s'intéresse à l'effet d'un inhibiteur des intégrases du VIH-1 et de HTLV-1 sur la réplication de HTLV-2 chez des patients co-infectés avec HIV-1. Comme précédemment, le traitement est associé à une augmentation de la charge provirale durant les 24 premières semaines avant un retour à la valeur initiale à 48 semaines (Abad-Fernandez *et al.*, 2014).

## • HTLV-2, un virus n'induisant pas de leucémie

HTLV-2 a été initialement identifié chez un patient atteint d'une leucémie à tricholeucocytes, bien que l'existence de cette maladie soit discutée. Quelques cas ont montré le développement d'autres types de leucémies, la leucémie prolymphocytaire T par exemple, chez des individus infectés par le virus. Cependant, des études ont ensuite montré qu'il n'y avait pas de lien entre l'infection et ces leucémies puisque de nombreux individus développent le même type de maladies sans être infectés par HTLV-2. De plus, chez les patients leucémiques et infectés par HTLV-2, le provirus n'est pas retrouvé intégré dans les lymphocytes qui prolifèrent (pour revue : Roucoux *et* Murphy, 2004). Plus récemment, l'analyse du taux de mortalité chez plus de 1600 individus suivis sur 16 ans et non infectés, ou infectés par HTLV-1 ou par HTLV-2 montre une association entre l'infection par HTLV-2 et un taux accru de décès causés par des cancers. Une activation chronique du système immunitaire lors de l'infection ou un comportement à risque comme une surconsommation d'alcool pourraient expliquer ce taux de mortalité accru (Biswas *et al.*, 2010).

Aux Etats-Unis, une étude a été menée sur une cohorte de 153 individus HTLV-1, 386 individus HTLV-2 et 795 individus non infectés sur 14 ans. En 1998 le premier rapport d'étude de cette cohorte indique que les individus infectés par HTLV-1 et HTLV-2 ont un taux absolu de lymphocytes supérieur à celui des individus non infectés (6% pour HTLV-1, 10% pour HTLV-2), (Murphy *et al.*, 1998). En 2000, le taux absolu de lymphocytes est 11% plus élevé chez les individus HTLV-2 que chez les personnes non infectées, alors que le taux de lymphocytes des patients HTLV-1 est identique à celui des individus exempts d'infection (Glynn *et al.*, 2000). En 2008, le taux supérieur de lymphocytes chez les individus HTLV-2 est maintenu. Ce taux élevé ne privilégie pas une population de lymphocytes par rapport à une autre. En conclusion HTLV-2 est associé à une augmentation du taux de lymphocytes, appelée lymphocytose (Figure 16). Ce nombre élevé de lymphocytes pourrait être lié à une

réponse inflammatoire de l'hôte vis à vis de l'infection ou bien à une surproduction d'interleukine-2 sous l'effet de la protéine Tax (Bartman *et al.*, 2008).



# Figure 16 : Nombre absolu de lymphocytes dans le sang chez des individus non infectés ou infectés par HTLV-1 ou HTLV-2

Les individus infectés par HTLV-2 ont un taux absolu de lymphocytes supérieur aux individus non infectés ou infectés par HTLV-1. Cette augmentation du taux de lymphocytes est appelée lymphocytose (Modifié d'après Bartman *et al.*, 2008)

# 4. Etude comparative de HTLV-1 et HTLV-2 en lien avec la différence de pathogénicité entre les deux virus

HTLV-1 et HTLV-2 sont phylogénétiquement proches mais distincts en terme de pathologies. Comprendre les bases moléculaires à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus peut permettre de mieux appréhender le développement de la leucémie à cellules T de l'adulte. Tax1 étant impliquée dans la transformation des lymphocytes infectés et HBZ dans la prolifération des cellules infectées, des études ont comparé les rôles de Tax1 avec Tax2 et de HBZ avec la protéine antisens de HTLV-2, APH-2 (Gaudray *et al.*, 2002, Halin *et al.*, 2009). Une étude récente comparant le nombre de clones de cellules infectées et leur abondance entre des patients infectés par HTLV-1 et HTLV-2 apporte une nouvelle vision des bases moléculaires à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus (Melamed *et al.*, 2014).

# • Etude comparative de Tax1 et Tax2

Tax1 et Tax2 partagent 85% d'homologies en acides aminés et activent l'expression des gènes viraux à partir du LTR 5'. Malgré ces homologies, Tax1 et Tax2 ont une localisation intra-cellulaire et des domaines fonctionnels différents à l'origine de capacités de transactivation et de transformation variables.



#### Figure 17 : Domaines des protéines Tax1 (A.) et Tax2 (B.)

Tax1 possède 353 acides aminés tandis que Tax2 possèdent de 331 à 356 acides aminés selon le sous-type. Tax1 présente un domaine de liaison au motif PDZ absent chez Tax2. Tax2 possède une séquence absente chez Tax1 responsable de la localisation cytoplasmique (Modifié d'après la revue de Romanelli *et al.*, 2013)

Tax1 et Tax2 possèdent à leur extrémité N-terminale des domaines de liaison à CREB permettant l'interaction avec les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB (Figures 17.A et 17.B). Tax1 et Tax2 présentent aussi deux régions impliquées dans la liaison aux histones désacétylases CBP/p300 (Figures 17.A et 17.B). Ces interactions sont nécessaires à la transactivation de l'expression des gènes viraux à partir du LTR 5'. Tax1 et Tax2 sont toutes deux essentielles à l'expression des gènes viraux à partir du LTR 5'. Une étude montre que l'effet transactivateur de Tax1 est cependant plus fort que celui de Tax2 sur le promoteur viral. En effet la quantité de protéine Gag p19 dans le surnageant de cellules transfectées avec le clone moléculaire de HTLV-1 est plus importante que pour des cellules transfectées avec le clone moléculaire de HTLV-2 (Ye *et al.*, 2003).

Cependant le taux de p19 est mesuré par ELISA et il n'est pas possible de vérifier que l'anticorps utilisé dans ce kit reconnait avec la même affinité la protéine Gag p19 de HTLV-1 et celle de HTLV-2. Par ailleurs une étude antérieure avait montré que Tax1 et Tax2 avaient la même activé transcriptionnelle sur des plasmides codant la luciférase sous le contrôle du promoteur LTR (Semmes et al., 1996) tandis qu'au contraire un second travail démontrait une activité transcriptionnelle plus forte de Tax1 sur le promoteur LTR par rapport à Tax2 suite à l'expression transitoire de l'une ou l'autre des protéines (Chevalier et al., 2012). Si une différence d'activité transactivatrice entre Tax1 et Tax2 existe, celle-ci pourrait être reliée aux localisations distinctes des deux protéines. En effet, Tax1 est essentiellement localisée dans le noyau mais est retrouvée aussi dans le cytoplasme au niveau des centrosomes (Figure 18.A) tandis que Tax2 est essentiellement cytoplasmique avec une répartition plus diffuse dans le cytoplasme par comparaison avec Tax1 (Figure 18.B). Tax1 et Tax2 possèdent une séquence de localisation nucléaire et une séquence d'export nucléaire (Figures 17.A et 17.B). De plus Tax2 présente une séquence, absente chez Tax1, responsable de la localisation cytoplasmique (Figures 18.A et 18.B), (Meertens et al., 2004).



## Figure 18 : Localisation des protéines Tax1 (A.) et Tax2 (B.)

Des cellules Hela ont été transfectées avec des plasmides codant les protéines Tax1 et Tax2 et observées en immunofluorescence. Tax1 est essentiellement nucléaire tandis que Tax2 est principalement cytoplasmique. (Grossissement x40, modifié d'après Meertens *et al.*, 2004)

La voie NF-KB se divise en deux voies de signalisation répondant à des stimuli différents, la voie classique ou canonique et la voie alterne ou non canonique. Tax1 et Tax2 activent constitutivement la voie NF-KB classique par interaction avec un activateur de la voie (IKK<sub>Y</sub>/NEMO). Par ailleurs, Tax1 présente dans sa région centrale un motif permettant l'activation de la voie non canonique de NF-KB. Ce motif est absent chez Tax2 qui n'active donc pas la voie NF-KB alterne (Higuchi *et al.*, 2007).

A son extrémité C-terminale, Tax1 présente un domaine de liaison au motif PDZ (PDM : "PDZ binding motif") absent chez Tax2 (Figures 17.A et 17.B). Ce domaine est nécessaire à Tax1 pour interagir avec des suppresseurs de tumeurs comme hDLG et hSCRIB. Une étude suggère que ces deux domaines sont essentiels à Tax1 pour immortaliser des lymphocytes T (Higuchi *et al.*, 2007). Cette étude peut être mise en corrélation avec un article précédent montrant que Tax2 est moins efficace que Tax1 dans la transformation de fibroblastes de rat *in vitro* (Endo *et al.*, 2002). De façon intéressante seuls certains sous-types du papillomavirus humain sont associés au cancer du col de l'utérus. Ces sous-types sont ceux dont la protéine virale oncogène E6 porte aussi un domaine PDM (Javier, 2008).

Cependant d'autres études montrent que Tax2 a la capacité d'immortaliser des lymphocytes. Pour étudier le rôle de Tax2, un clone moléculaire de HTLV-2 a été délété de sa région codant Tax2. Par ailleurs, un promoteur CMV "immediate early enhancer" a été cloné au niveau du LTR afin que la transcription des gènes viraux soit assurée en absence de Tax2. La coculture de lymphocytes primaires humains avec des cellules produisant du virus HTLV-2 ne codant pas Tax2 n'induit pas l'immortalisation des lymphocytes contrairement à du virus HTLV-2 non mutant (Ross et al., 1996). Dans une autre étude, la transduction de vecteurs lentiviraux permettant d'exprimer Tax2 dans des lymphocytes T CD4+ primaires humains induit l'immortalisation des lymphocytes transduits. Cette immortalisation est liée à l'activation de l'autophagie par Tax2 (Ren et al., 2012). Etonnamment une étude plus récente souligne que Tax2 immortalise de façon plus efficace que Tax1 des lymphocytes T CD4+ humains après transduction des deux protéines (Imai et al., 2013). Ces deux dernières études sont réalisées dans des lymphocytes primaires humains alors que les études de Higuchi ou de Endo sont réalisées sur des fibroblastes de rat ou des lignées de lymphocytes. Dans ces dernières études, l'expression des protéines résultent d'une transduction via des vecteurs lentiviraux. Ainsi Tax2 immortaliserait les lymphocytes T CD4+ humains de façon plus efficace que Tax1 (pour revue : Ren et Chang, 2013). Cependant, HTLV-2 infecte peu les

64

lymphocytes T CD4+ *in vivo* : il serait donc intéressant d'étudier la capacité de Tax2 à immortaliser les lymphocytes T CD8+.

	Tax1	Tax2
Localisation	Essentiellement nucléaire	Essentiellement cytoplasmique
Transactivation de l'expression des gènes viraux	Oui	Oui
Activation de la voie NF- <u>K</u> B	Classique + Alterne	Classique
Domaine de liaison au motif PDZ	Oui	Non
Immortalisation de lymphocytes primaires humains	Oui	Oui
Transformation de fibroblastes de rat	Forte	Moyenne
Inhibition de l'apoptose	Oui	Oui
Induction de micronuclei	Oui	Non
Inhibition de p53	Forte	Faible

 Tableau 3 : Principaux points communs et différences entre Tax1 et Tax2

Outres les différences en terme de localisation, d'activation de la voie alterne de NF-KB et d'interaction avec des protéines à domaine PDZ, d'autres études comparent Tax1 à Tax2. Tax1 induit plus de micronuclei, que Tax2, reflétant ainsi des dommages à l'ADN plus conséquents (Semmes *et al.*, 1996), inhibe p53 de façon plus efficace (Mahieux *et al.*, 2000), stimule l'expression de d'avantage de cytokines pro-inflammatoires que Tax2 (Banerjee *et al.*, 2007). Tax1 et Tax2 présentent également des patterns de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, acétylations, ubiquitinations, sumoylations, différents (Figures 17.A et 17.B). Ces modifications post-traductionnelles sont impliquées dans le contrôle de la localisation de Tax1 et Tax2 et modulent les interactions de Tax1 et Tax2 avec des protéines cellulaires. L'ubiquitination et la SUMOylation de Tax1 sont notamment nécessaires pour l'activation de la voie NF-KB. Ce n'est pas le cas pour Tax2 (Journo *et al.*, 2013). Cependant une difficulté liée à l'interprétation de l'ensemble de ces études consiste souvent en l'impossibilité de contrôler que les deux protéines

transfectées ou transduites sont exprimées à des taux similaires. De plus, les protéines Tax1 et Tax2 sont surexprimées dans l'ensemble de ces études.

Les différences majeures entre les deux protéines concernent la localisation, l'absence de domaine PDM chez Tax2 et l'activation de la voie NF-KB alterne pour Tax1 seulement (Tableau 3). La transduction de Tax1 dans une lignée de lymphocytes dérégule l'expression de 159 gènes cellulaires tandis que Tax2 dérégule 68 gènes. Sur l'ensemble de ces gènes, 49 sont dérégulés à la fois par Tax1 et Tax2. Cette étude de transcriptomique souligne les différences existant entre les deux protéines virales (Chevalier et al., 2012). Cependant, Tax1 et Tax2 partagent de nombreuses propriétés comme la capacité d'activer l'expression des gènes viraux à partir du promoteur 5', d'activer la voie NF-KB classique ou d'inhiber l'apoptose (Tableau 3). Les deux protéines sont capables d'immortaliser des lymphocytes humains : ces résultats remettent en cause que la différence de pathogénicité entre les deux virus soit due à une capacité accrue de Tax1 à immortaliser les cellules cibles. Le manque de données in vivo, chez des modèles de souris humanisées par exemple, rend difficile d'admettre que la différence de pathogénicité entre les deux virus chez l'Homme soit due uniquement aux différences observées entre Tax1 et Tax2 dans des systèmes de surexpression in vitro.

#### • Etude comparative de HBZ et APH-2

HBZ et APH-2 sont les deux protéines antisens de HTLV-1 et HTLV-2 respectivement. Après la découverte de HBZ, le rôle de la protéine dans le maintien du processus leucémogène a été démontré. Ainsi la comparaison de APH-2 avec HBZ pourrait aussi permettre d'appréhender la différence de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2 (Tableau 4).

Comme HBZ, APH-2 inhibe l'activation de la transcription médiée par Tax. HBZ via son domaine leucine zipper (Figure 19.A) et APH-2 via un domaine LXXLL (Figure 19.B) interagissent avec les facteurs de la transcription ATF/CREB, empêchant le recrutement de ces facteurs par Tax1 ou Tax2 (Halin *et al.*, 2009, Yin *et al.*, 2012). HBZ et APH-2 sont nucléaires mais APH-2 n'est pas située au niveau des nucléoles contrairement à HBZ (Figure 20), (Halin *et al.*, 2009).

L'expression de APH-2, comme celle de HBZ, est détectée chez pratiquement tous les individus HTLV-2 testés (56 individus sur 60). De plus une corrélation entre l'expression de APH-2 et la charge provirale est trouvée. Mais contrairement à HBZ, APH-2 n'est pas capable d'induire la prolifération de cellules dépendantes de l'interleukine-2 en absence d'interleukine-2 (Tableau 4), (Douceron *et al.*, 2012).

Cependant des lapins inoculés avec des cellules infectées par du virus HTLV-2 dont le génome est tronqué dans la partie 3' qui code APH-2 ont une charge provirale plus faible que des lapins inoculés avec du virus sauvage (Cockerell *et al.*, 1996). Cette expérience suggère que APH-2, comme HBZ aurait un rôle dans le maintien de l'infection *in vivo*.



# Figure 19 : Domaines des protéines HBZ (A.) et APH-2 (B.)

La protéine HBZ se compose de 206 acides aminés, la protéine APH-2 de 183 acides aminés. HBZ a un domaine d'interaction avec CBP/p300 absent chez APH-2. De plus, via son domaine bZIP, HBZ interagit avec JunD. Cette interaction permet l'activation de l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase.





## Figure 20 : Localisation des protéines HBZ (A.) et APH-2 (B.)

Des cellules Hela ont été transfectées avec des plasmides codant les protéines HBZ ou APH-2 et observées en microscopie confocale. HBZ et APH-2 sont nucléaires. De plus HBZ colocalise avec la nucléoline contrairement à APH-2 (Modifié d'après Halin *et al.*, 2009).

	HBZ	APH-2
Expression	Exprimée chez tous les Expression corrélée	patients infectés à la charge provirale
Localisation	Nucléaire au niveau des nucléoles	Nucléaire
Inhibition de l'activation de la transcription médiée par Tax	Oui	Oui
Interaction avec JunD	Oui	Non
Interaction avec CBP/p300	Oui	Non
Induction de la prolifération	Oui	Non

Tableau 4 : Principaux points communs et différences entre HBZ et APH-2

# • Etude comparative de la clonalité entre des individus infectés par HTLV-1 et par HTLV-2

Les études comparant Tax1 à Tax2 ou HBZ à APH-2 sont pour la plupart des expériences réalisées *in vitro* : les protéines sont surexprimées dans des lignées cellulaires. Il me paraît difficile d'admettre que les différences observées *in vitro* soient à elles-seules responsables de la différence de pathogénicité entre les deux virus *in vivo*.

Des études récentes comparant la clonalité entre des individus infectés par HTLV-1 ou par HTLV-2 permettent d'appréhender différemment la différence de pathogénicité entre les deux virus. Nous avons évoqué dans la partie II le fait que les individus infectés par HTLV-2 ont un nombre inférieur de clones mais de forte abondance tandis que les individus asymptomatiques infectés par HTLV-1 ont un grand nombre de clones d'abondance plus faible (Figures 7 et 21), (Melamed *et al.*, 2014). Ces résultats montrent que HTLV-2 est capable d'induire la prolifération des lymphocytes infectés de façon plus efficace que HTLV-1 dans le cas des patients non atteints de l'ATL. Ces données sont à mettre en corrélation avec l'étude de Imai montrant que Tax2 est plus efficace que Tax1 pour immortaliser les lymphocytes (Imai *et al.*, 2013). De façon étonnante, l'abondance des clones chez les individus HTLV-2 ressemble à celle des patients ATL. L'ensemble de ces études remet en cause le paradigme qui veut que la prolifération des cellules infectées induite par Tax1 et HBZ soit uniquement responsable du développement de l'ATL (Figures 7 et 21).







Schémas interprétatifs du nombre de clones de cellules infectées par HTLV-1 ou par HTLV-2 et de leur abondance chez des individus infectés (Figure 7). Chaque couleur correspond à un clone de cellules infectées. Les individus infectés par HTLV-2 ont un nombre de clones plus faible mais de plus forte abondance suggérant une forte prolifération des cellules infectées : ce résultat remet en cause que l'ATL résulte uniquement d'une prolifération des cellules infectées par HTLV-1.

# IV. Le rôle des interférons de type I dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2, un axe peu exploré

Dans le chapitre précédent, nous avons évoqué que les protéines Tax et HBZ étaient impliquées dans le développement de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) chez les patients infectés par HTLV-1. Cependant, le mécanisme exact du développement de la maladie reste encore mal compris. Une étude récente (Melamed *et al.*, 2014) montre que les clones de lymphocytes infectés par HTLV-2 prolifèrent de façon plus abondante que les clones de lymphocytes infectés par HTLV-1 : le développement de l'ATL ne reposerait donc pas uniquement sur l'induction de la prolifération cellulaire par Tax et HBZ. D'autres paramètres, comme la réponse de l'hôte, notamment la réponse interféron face aux infections par HTLV-1 et HTLV-2, pourraient être impliqués dans le développement de l'ATL.

## 1. Les interférons, des acteurs majeurs du système immunitaire

## • La réponse interféron au sein du système immunitaire

L'immunité reflète la capacité d'un organisme à se défendre contre le non soi. La réponse immune est médiée par différents types cellulaires et par des facteurs solubles. On distingue la réponse immunitaire innée qui est rapidement mise en place de la réponse immunitaire adaptative, plus tardive mais aussi plus spécifique. La réponse immunitaire adaptative garde en mémoire les spécificités du pathogène rencontré, permettant une réponse plus efficace lors d'une prochaine infection par le même pathogène. Immunité innée et adaptative collaborent dans l'élaboration de la réponse de l'organisme au cours d'une infection.

A titre d'exemple, des récepteurs nommés "PRR" (Pathogen Recognition Receptors) situés au niveau de la membrane plasmique, de la membrane des endosomes, ou dans le cytosol, permettent de détecter des motifs associés aux pathogènes appelés PAMPS (Pathogen associated molecular patterns) lorsqu'un microorganisme pénètre dans la cellule. Ces interactions sont à l'origine de la stimulation de l'expression de diverses molécules :

70

# Introduction IV. Le rôle des interférons dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2

- des prostaglandines, des chimiokines, et des cytokines inflammatoires qui permettent le recrutement et l'activation des phagocytes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) sur le lieu de l'infection.

- des cytokines antivirales comme les interférons de type I.

 - des molécules de co-stimulation (par exemple CD80, CD86) nécessaires à l'activation des médiateurs de la réponse immunitaire adaptative parmi lesquels on trouve les lymphocytes B, les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes T CD4+.

Les interférons sont donc des cytokines produites en première ligne de défense lors d'une infection. On compte trois grandes familles d'interférons. Parmi les interférons de type I se trouvent chez l'Homme les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  essentiellement et les interférons  $\varepsilon$ ,  $\kappa$  et  $\omega$  moins connus (pour revue : Platanias, 2005). L'interféron de type II ou IFN- $\gamma$  est majoritairement produit par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ et les cellules NK (natural killer), (pour revue : Young *et* Bream 2007). Une troisième classe d'interférons appelée IFN- $\lambda$  a été découverte plus récemment. Elle inclut les interférons  $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2,  $\lambda$ 3 aussi appelés IL-28a, IL-28B, IL-29 (pour revue : Uze *et* Monneron, 2007). Les interférons de type III se lient à un récepteur composé d'une chaîne du récepteur à l'interleukine-28 et d'une chaîne du récepteur à l'interleukine-10R2. Ils ont un rôle antiviral de façon similaire aux interférons de type I.

#### • La production des interférons de type I

La production des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) est initiée au sein de la cellule infectée par la reconnaissance d'un motif particulier associé au pathogène (PAMP) par un récepteur cellulaire (PRR) (Figure 22), (pour revue : Akira *et al.*, 2006). Les ARN hélicaces (RLR) et les TLR (Toll-like-receptor) font partie des PRR.

Les ARN hélicases RIG-I (RNA helicase retinoic acid inducible gene I) et MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) présentes dans le cytosol de la majorité des cellules sont spécialisées dans la reconnaissance des virus à ARN : leur domaine hélicase reconnaît les ARN double brin et les ARN simple brin à extrémité 5' triphosphate. Tandis que les ARN hélicases sont des récepteurs cytosoliques, les TLR sont des récepteurs membranaires localisés au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane des endosomes. Les TLR sont exprimés par les macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T mais aussi par des cellules épithéliales ou des
fibroblastes (pour revue : Akira *et al.*, 2006). Le récepteur TLR4 situé au niveau de la membrane plasmique reconnait le lipopolysaccharide des parois bactériennes mais aussi des protéines d'enveloppe virale, par exemple la protéine de fusion du virus respiratoire syncitial (RSV). Les récepteurs TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont présents au niveau des endosomes. L'ARN double brin peut être reconnu par le récepteur TLR3 tandis que les TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin et le TLR9 l'ADN double brin avec des îlots CpG. La localisation des TLR7 et TLR8 au niveau des endosomes permettrait d'éviter la reconnaissance des ARN messagers cellulaires présents dans le cytoplasme.

Différentes voies de signalisation sont déclenchées par l'interaction entre les motifs associés aux pathogènes (PAMPS) et leurs récepteurs (PRR) selon la nature et la localisation du récepteur (Figure 22). Les différentes voies de signalisation aboutissent à l'activation de la transcription des interférons  $\alpha$  et  $\beta$  (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) via la phosphorylation des facteurs de transcription IRF-3 et/ou IRF-7, leur association en dimère et leur migration vers le noyau. Seul un dimère de IRF-7 peut induire la synthèse d'IFN- $\alpha$ (excepté l'IFN- $\alpha$ 4). Or, contrairement à IRF-3 qui est synthétisé constitutivement dans de nombreux types cellulaires, IRF-7 est présent constitutivement en grande quantité dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes uniquement. Par ailleurs les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment un fort taux de TLR7 et TLR9 qui induisent la phosphorylation de IRF-7 suite à la reconnaissance de virus à ARN simple brin ou ADN double brin. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont considérées comme les cellules majeures produisant de l'IFN- $\alpha$  au cours d'une infection virale (pour revue : Ito et al., 2005). Cependant la majorité des autres types cellulaires est susceptible de produire de l'IFN-a. suite à l'induction de l'expression de IRF-7 sous l'action de l'IFN- $\beta$  (pour revue : Levy et al., 2002).

### • De la lutte antivirale à l'activation de la réponse immunitaire adaptative, diversité des rôles des interférons de type l

Les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) se lient sur un récepteur transmembranaire constitué de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2. L'engagement de IFNAR1 et IFNAR2 induit la phosphorylation de deux kinases associées au récepteur Jak1 (Janus Activated Kinase 1) et Tyk2 (Tyrosine kinase 2). Les deux kinases phosphorylent à leur tour les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1 et 2), qui migrent dans le noyau, s'associent au facteur IRF-9. Le complexe ainsi formé induit la transcription de plusieurs centaines de gènes de réponse à



### Figure 22 : Production des interférons de type I (IFN- $\alpha$ et IFN- $\beta$ )

Les virus sont reconnus par différentes familles de PRR (dont les TLR et RLR) situés au niveau de la membrane plasmique (TLR2, TLR4), de la membrane des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) ou dans le cytoplasme (RIG-I, MDA5, DAI). Les RLR sont exprimés dans la majorité des cellules. Les TLR sont exprimés par les macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T mais aussi par des cellules épithéliales ou des fibroblastes L'interaction entre les PRR et des motifs particuliers associés aux pathogènes comme des glycoprotéines virales, des ARN ou ADN double brin ou des ARN simple brin induisent des voies de signalisation aboutissant à la synthèse des IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  : Myd88 est activée suite à la stimulation des TLR7, TLR8 et TLR9 et induit la phosphorylation de IRF-7 ; TRIF est activée suite à la stimulation de TLR3, IPS-1/MAVS suite à la stimulation de RIG-I et MDA5. TRIF et IPS-1/MAVS induisent la phosphorylation de IRF-3. IRF-3 et IRF-7 phosphorylés s'associent en dimères, migrent vers le noyau et activent la synthèse des IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ . Seul un dimère de IRF-7 peut induire la synthèse d'IFN- $\alpha$ . Les TLR7, 8 et 9 et le facteur IRF-7 aboutissant à la synthèse d'IFN- $\alpha$  sont exprimés constitutivement dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les pDC sont considérées comme les cellules majeures produisant de l' IFN- $\alpha$ .

l'interféron appelés ISG (Interferon Stimulated Genes), (Figure 23), (pour revue : Platanias, 2005).

Parmi les protéines codées par les gènes de réponse à l'interféron (ISG), certaines sont connues pour inhiber la réplication des virus à diverses étapes du cycle viral (Tableau 5). Cependant, de nombreuses protéines stimulées par les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  ont une fonction méconnue. En 2011, une étude compare l'effet de plus de 380 gènes de réponse à l'interféron sur la réplication de différents virus, le virus de l'hépatite C (Flavivirus ARN simple brin), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (rétrovirus, ARN simple brin), le virus de la fièvre jaune (Flavivirus, ARN simple brin), le virus de la fièvre jaune (Flavivirus, ARN simple brin), le virus de Chikungunya (Alphavirus, ARN simple brin), le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (Alphavirus, ARN simple brin) ou encore le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (Alphavirus, ARN simple brin), (Schoggins *et al.*, 2011). De façon intéressante, l'expérience met en évidence trois groupes de gènes de réponses à l'interféron (ISG) : des ISG à très forte activité antivirale, des ISG à activité antivirale modérée et, étonnamment, des ISG à activité pro-virale. *In vitro* la combinaison de l'expression de seulement deux ISG peut diminuer la réplication de 90% d'un virus comme le virus de l'hépatite C.

Parmi les ISG à activité pro-virale, ADAR1 stimule la réplication de l'ensemble des virus testés par Schoggins. La protéine ADAR1 possède deux isoformes, ADAR1-p150 dont l'expression est induite par les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et ADAR-p110 qui est constitutivement exprimée. Les deux formes de ADAR1 éditent les ARN à caractère double brin induisant des modifications de la séquence et de la structure des ARN (pour revue : Samuel, 2011). L'effet pro-viral de la protéine ADAR1 avait déjà été décrit pour le virus de la stomatite vésiculaire (Nie *et al.*, 2007) et le VIH-1 (Phuphuakrat et al., 2008, Doria *et al.*, 2009) tandis que l'effet de la protéine sur la réplication de certains virus, comme le virus de la rougeole, est débattu, certaines études montrant un effet pro-viral (Toth *et al.*, 2009), d'autres un effet antiviral (Ward *et al.*, 2011). ADAR1 édite le génome de HTLV-2 (Ko *et al.*, 2012) mais l'effet de l'éditing sur la réplication du virus n'a pas été étudié. Le rôle de ADAR1 dans la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 sera précisé dans la partie Résultats du manuscrit. L'étude de Schoggins a aussi analysé l'effet de l'expression d'un ISG à activité antivirale (IFI6) combiné à un ISG à activité pro-virale (ADAR1) sur la



### Figure 23 : Voie de signalisation des interférons de type I (IFN- $\alpha$ et IFN- $\beta$ )

L'engagement du récepteur aux IFN-I composés des sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 induit la phosphorylation des protéines kinases Tyk2 et Jak1 qui elles-mêmes phosphorylent les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Une fois phosphorylés, STAT1 et STAT2 s'associent avec le facteur IRF-9, migrent vers le noyau et activent la transcription des gènes de réponse à l'interféron (ISG).

Protéines codées par des gènes de réponse à l'interféron	Fonctions décrites		
PKR (Protein kinase R)	Inhibition de la traduction via la phosphorylation du facteur d'initiation eiF2 $\alpha$		
2'5'OAS-RNAseL	Dégradation des ARN		
TRIM5α	Inhibition de l'importe nucléaire Dégradation des produits de transcription inverse		
APOBEC3G, APOBEC3F, ADAR1	Editing (Modification de la séquence) des ARN viraux		
IFITM1, 2, 3	Inhibition de l'entrée virale		
GTPases Mx	Inhibition de la transcription		
Tetherine	Inhibition du relargage des particules virales enveloppées		
IRF-1	Régulateur positif de la production des IFN-I		
IRF-2	Régulateur négatif de la production des IFN-I		
RIG-I, MDA5	PRR cytoplasmique		

Tableau 5 : Exemple de quelques protéines dont l'expression est induite par les interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ )

réplication du virus de la fièvre jaune. L'effet de l'ISG à action antivirale l'emporte sur celui de l'ISG à action pro-virale dans ce cas. Cette étude montre que l'inhibition de la réplication des virus par les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) repose sur une combinaison de plusieurs ISG à activité antivirale et pro-virale.

Parmi les ISG figurent aussi des régulateurs négatifs et positifs de la voie de signalisation des interférons de type I qui modulent l'intensité de la réponse interféron (pour revue : Ivashkiv *et* Donlin, 2014). Les interférons induisent également l'expression de cytokines, chemokines, et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité nécessaires à la présentation des antigènes. Ainsi, les interférons de type I orchestrent les réponses immunitaires innée et adaptative. Les interférons de type I stimulent l'activité cytotoxique des cellules NK (natural killer), augmentent la différenciation, la maturation, la migration et la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (APC), et jouent sur la différenciation, l'activation et la survie des lymphocytes B et T effecteurs et mémoires (pour revues : Hervas-Stubbs *et al.*, 2011, Tough *et al.*, 2012).

# 2. L'effet des interférons de type I au cours des infections par HTLV-1 et HTLV-2, des données incomplètes et contradictoires

Le rôle des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) au cours d'une infection par HTLV-1 et notamment dans le développement de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) reste peu documenté. De plus les résultats sont souvent contradictoires.

L'IFN- $\alpha$ , combiné à d'autres antiviraux (AZT et/ou arsenic trioxide), est recommandé pour traiter les patients atteints des formes chronique, progressive et leucémique aigue de l'ATL suggérant un contrôle de la réplication virale via l'IFN- $\alpha$  (pour revue : Bazarbachi *et al.*, 2011). D'autres études sont en faveur d'un contrôle de la réplication virale sous l'effet des IFN- $\alpha$  ou IFN- $\beta$ . Une faible production d'IFN- $\alpha$  *ex vivo* par des cellules dendritiques plasmacytoïdes de patients infectés par HTLV-1 corrèle avec une charge provirale élevée (Hishizawa *et al.*, 2004) suggérant aussi un contrôle de la réplication virale par l'IFN- $\alpha$ . Une autre étude montre que l'IFN- $\beta$  inhibe l'expression virale : la culture de cellules mononucléaires de sang périphériques de patients ATL avec des cellules 293T qui produisent de l'IFN- $\beta$  induit une diminution de la production de protéines virales. De même pour des lignées de lymphocytes infectés par HTLV-1 et dépendants de l'interleukine-2 cocultivés avec des cellules humaines 293T ou des

cellules murines NIH 3T3. L'addition d'anticorps anti-IFN- $\beta$  à la coculture restaure la production virale par les lymphocytes infectés signifiant que l'IFN- $\beta$  produit par les cellules stromales inhibe l'expression virale au sein des lymphocytes infectés (Kinpara *et al.*, 2009).

Etonnamment, d'autres études montrent qu'au contraire, les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes aux interférons  $\alpha$  et  $\beta$ . Des clones de lymphocytes T isolés de patients HAM/TSP et proliférant indépendamment de l'interleukine-2 sont insensibles à un traitement à l'IFN- $\beta$  (Smith *et al.*, 1999). De même, des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement exogène à l'IFN- $\alpha$  malgré l'induction de gènes de réponse à l'interféron (Nasr *et al.*, 2003). L'IFN- $\alpha$  seul a un effet très faible sur la prolifération de cellules chroniquement infectées par HTLV-1 contrairement à l'IFN-lphacombiné à l'arsenic trioxide. De même, l'IFN- $\alpha$  seul n'induit pas l'apoptose des cellules infectées, n'entraîne pas de diminution de l'expression de la protéine Tax1 et n'empêche pas l'activation constitutive de la voie NF-KB contrairement à l'arsenic ou à la combinaison arsenic et IFN- $\alpha$ . De façon intéressante, la combinaison arsenic et IFN- $\alpha$  est plus efficace que l'arsenic seul, ce qui signifie que l'IFN- $\alpha$  augmente les effets de l'arsenic (Bazarbachi et al., 1999, El-Sabban et al., 2000, Mahieux et al., 2001). Des résultats similaires sont obtenus pour une lignée de lymphocytes chroniquement infectés par HTLV-2 (Mahieux et al., 2001). Mise à part cette dernière étude, aucune donnée n'est publiée concernant l'effet des interférons de type I sur l'infection par HTLV-2. A l'échelle moléculaire, un travail montre qu'HTLV-1 inhibe la phosphorylation de STAT1 et Tyk2 à l'origine d'une réduction de l'expression des gènes de réponse à l'interféron (Feng et Ratner, 2008). La protéine Tax1 de HTLV-1 entre en compétition avec STAT2 pour la liaison des co-activateurs de la transcription CBP/p300 (Zhang et al., 2008). Ces données suggèrent que la voie de signalisation induite par les interférons de type I est inhibée in vitro dans des cellules infectées par HTLV-1.

De plus, la présence d'une signature interféron chez les patients HAM/TSP suggère une implication de la réponse interféron dans le développement de la maladie (Tattermusch *et al.*, 2012). Des leucocytes issus du sang de patients HAM/TSP surexpriment des gènes de réponse aux interférons de type I. Sur 80 gènes surexprimés chez les patients HAM/TSP par rapport à des patients asymptomatiques, 23 gènes

correspondent à des gènes de réponse à l'interféron. Cette signature interféron est caractéristique des patients infectés par HTLV-1 développant la HAM/TSP et n'est pas détectée pour des individus infectés mais asymptomatiques ou bien des patients non infectés mais atteints d'une maladie similaire à la HAM/TSP, la sclérose en plaque. La surexpression des gènes de réponse à l'interféron est corrélée avec la sévérité de la maladie. Dans cette même étude, des leucocytes des patients HAM/TSP sont isolés et traités *ex vivo* à l'IFN- $\alpha$ . Le traitement n'induit pas de diminution de l'expression de la protéine Tax et seulement une faible diminution de la protéine Gag dans les lymphocytes T CD4+ infectés (Tattermusch *et al.*, 2012).

Ainsi les résultats discutant du rôle des interférons  $\alpha$  et  $\beta$  dans l'infection par HTLV-1 sont discordants : certaines études montrant une résistance des cellules infectées à un traitement aux interférons  $\alpha$  et  $\beta$  tandis que d'autres indiquent un contrôle de la réplication virale par les interférons. Dans la partie Résultats du manuscrit, j'apporterai de nouvelles données afin de concilier ces résultats contradictoires concernant HTLV-1 d'une part, et de compléter les connaissances sur le rôle de l'interféron  $\alpha$  lors d'une infection par HTLV-2 d'autre part.

# V. Vers un modèle liant l'effet des interférons de type I aux pathologies induites par des infections virales persistantes

Afin d'éclaircir le rôle des interférons de type I, notamment de l'interféron  $\alpha$ , dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2, j'ai décidé d'étudier dans ce chapitre la relation entre la réponse interféron de type I et les infections virales persistantes. Le but de cette étude bibliographique est d'établir un modèle liant l'effet de la réponse interféron de type I aux pathologies associées aux infections virales persistantes.

# 1. Infections virales persistantes et problématique du rôle des interférons de type I dans la persistance de l'infection

On distingue deux types d'infections virales : infection virale aiguë et infection virale persistante (Figure 24). Une infection virale aiguë se caractérise par un développement rapide de la maladie, associé à une rapide production de particules virales avant leur élimination par les actions combinées des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les virus de la grippe, les rhinovirus ou les rotavirus sont par exemple responsables d'infections aiguës. En l'absence de contrôle par le système immunitaire, le virus se multiplie et se propage rapidement ; l'infection est dite fulminante et peut être mortelle. Les virus Ebola ou Lassa sont par exemple à l'origine d'infections fulminantes chez l'Homme.

Une infection virale est dite persistante quand le virus n'est pas éliminé par la réponse immunitaire et persiste au sein de l'organisme (Figure 24, Tableau 6). Les rétrovirus HTLV-1, HTLV-2, VIH-1, VIH-2 persistent dans l'organisme tout au long de la vie de l'individu après l'infection. Les virus de l'hépatite C (HCV) et de l'hépatite B (HBV) peuvent aussi persister dans l'organisme et être à l'origine de cirrhoses du foie et d'hépatocarcinomes (pour revues : Lavanchy, 2004, Lavanchy, 2009). Les papillomavirus (HPV) peuvent provoquer selon le type des lésions de la peau ou des muqueuses, comme les verrues ou des maladies plus graves comme des cancers cervicaux. HPV-16 est par exemple responsable de 50 à 70% des cancers du col de l'utérus (pour revue : Zur Hausen, 2002). La famille des Herpesviridae comprend huit virus responsables d'infections persistantes chez l'Homme (pour revue : Grinde *et al.*, 2013). Les virus de l'herpès, HSV-1 et HSV-2 persistent de façon latente notamment dans les ganglions

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

nerveux et sont par exemple à l'origine d'herpès oro-faciaux connus sous le nom de boutons de fièvre lors de phases de réactivation. Le virus de la varicelle et du zona (VZV), comme son nom l'indique, est à l'origine de la varicelle et du zona. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) infecte plus de 95% des adultes aux Etats-Unis (d'après le CDC, 2009). L'infection par EBV, généralement asymptomatique, est dans certains cas à l'origine de graves maladies comme le lymphome de Burkitt ou le cancer du naso-pharynx. Le cytomégalovirus (CMV), les virus de l'herpès 6 et 7 (HHV-6 et HHV-7) infectent 30 à 90% de la population ; ces infections sont généralement asymptomatiques. Le virus de l'herpès 8 (HHV-8) est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi, qui se développe notamment chez les individus co-infectés par le VIH-1 et immunosupprimés.





Les infections virales aiguës, caractérisées par une rapide production de particules virales avant leur élimination se distinguent des infections virales persistantes. Au cours des infections persistantes chroniques et lentes, la production virale persiste à des niveaux variables tout au long de la vie l'organisme. Les infections latentes sont caractérisées par des phases quiescentes suivies de phases de réactivation de l'expression virale. (Modifié à partir de "Principles of Virology", 3rd edition, volume 2)

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

Virus	Familles	Maladies associées
HBV	Hepadnaviridae (ADN bicaténaire)	Cirrhose du foie, hépatocarcinome
HCV	Flaviridae (ARN+ simple brin)	Cirrhose du foie, hépatocarcinome
VIH-1, VIH-2		SIDA
HTLV-1	Retroviridae (ARN+ simple brin)	ATL HAM/TSP
HTLV-2		rares cas de HAM/TSP
HSV-I, HSV-II	Herpesviridae (ADN bicaténaire)	Herpès génital, bouton de fièvre
VZV (HHV-3)		Varicelle, Zona
EBV (HHV-4)		Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, Carcinome du naso-pharynx
CMV (HHV-5)		Pneumonie, inflammation de la rétine
HHV-6, HHV-7		Roséoles chez l'enfant
HHV-8 (KSHV)		Sarcome de Kaposi, lymphome des séreuses
HPV-16, HPV-18	Papillomaviridae (ADN bicaténaire)	Cancer cervical, cancer cutané, cancer de l'oropharynx
MCPyV	Polyomaviridae (ADN bicaténaire)	Carcinome des cellules de Merkel

### Tableau 6 : Exemples de virus responsables d'infections virales persistantes chez l'Homme

Les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) constituent une première ligne de défense contre les virus. L'expression de quelques gènes de réponse à l'interféron (ISGs) seulement suffit à empêcher pratiquement toute réplication pour le virus de l'hépatite C par exemple *in vitro* (Schoggins et *al.*, 2011). Comment concilier alors la puissance de la réponse interféron de type I avec des infections virales persistantes *in vivo* ? Comment la réponse interféron de type I maîtrise-t-elle l'infection par les virus persistants ? Et à l'inverse comment les virus contrôlent-ils ou échappent-ils à la réponse interféron de type I et persistent à long terme dans l'organisme ?

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

# 2. Les infections virales persistantes induisent-elles une production des interférons de type I ?

### • Production des interférons de type I par les cellules infectées

Lors des premières étapes de l'infection d'une cellule cible, la reconnaissance des protéines structurales et des génomes ADN ou ARN des virus peut être à l'origine d'une production d'interférons de type I (Figure 22). Chez les herpesviridae par exemple, les particules virales de HSV, CMV et VZV sont reconnues par TLR2 au niveau de la membrane plasmique probablement via l'interaction entre les protéines structurales virales et le récepteur ; les motifs CpG des génomes ADN de HSV-1 et HSV-2 sont reconnus au niveau des endosomes par TLR9 ; l'ADN double brin de CMV et HSV-1 est reconnu également dans le cytosol par le récepteur DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors) identifié en 2007 (pour revue : Vandevenne et al., 2010). L'ARN du génome de HCV est reconnu par RIG-I dans le cytoplasme et TLR3 dans les endosomes (pour revue : Horner *et* Gale, 2013). Trim $5\alpha$  est un facteur de restriction qui bloque l'infection par le VIH-1 peu après l'entrée du virus dans la cellule-hôte en reconnaissant la capside virale (Tableau 7). Trim $5\alpha$  agit de plus comme un PRR stimulant la synthèse d'interféron  $\beta$ . En effet l'interaction de Trim $5\alpha$  avec la capside induit l'activité E3 Ubiquitine ligase de Trim $5\alpha$  qui active alors la voie NF-KB à l'origine de la synthèse d'interféron β (Pertel *et al.*, 2011).

Dans un second temps, des acides nucléiques viraux et des protéines synthétisées au cours des cycles viraux sont également reconnus par des PRR (Figure 22). Par exemple, les petits ARN double brin codés par EBV et HPV servent de matrice dans le cytoplasme à l'ARN polymérase III : à partir de ces matrices, l'ARN polymérase III synthétise des ARN à extrémités 5' triphosphate reconnus par RIG-I. Ainsi certains virus à ADN activent aussi RIG-I. (Amsler *et al.*, 2013). L'ADN produit lors de la transcription inverse des génomes du VIH-1 et VIH-2 est reconnu par le récepteur cytosolique GMP-AMP cyclique synthase identifié en 2013 (Sun *et al.*, 2013, Lahaye *et al.*, 2013). D'autres protéines, comme la tetherine, participent également à l'activation de la synthèse des interférons de type I lors d'une infection par VIH-1 sans être pourtant des PRR (Tableau 7). La tetherine (ou BST2) est une protéine transmembranaire dont l'expression est induite par les interférons de type I. L'infection de Iymphocytes T CD4+ par des virus VIH-1 modifiés pour ne pas inhiber la tetherine induit une phosphorylation de IRF-3 et une

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

production d'interféron  $\beta$  dépendante de l'expression de la tetherine (Galao *et al.*, 2012). Les auteurs proposent le mécanisme suivant : la tetherine retiendrait les particules virales à la membrane plasmique, induirait leur endocytose, facilitant ainsi la reconnaissance de l'ARN viral par TLR3 au niveau des endosomes.

A ma connaissance, aucune étude ne porte sur l'induction des interférons de type I par les lymphocytes infectés concernant HTLV-1 et HTLV-2.

# • Le cas particulier de la production d'interféron $\alpha$ par les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) expriment constitutivement TLR7, TLR9 et IRF-7 et sont considérées comme les cellules majeures produisant de l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) lors d'une infection virale (Figure 22).

Ainsi, des particules virales d'HTLV-1 induisent la production d'IFN- $\alpha$  par des pDC via la voie TLR7. Cependant cette étude n'indique pas si une infection productive est nécessaire ou non à la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC en contact avec HTLV-1 (Colisson *et al.*, 2010). Ces résultats sont cependant en contradiction avec l'étude de Hishizawa qui montre que des pDC isolées de patients infectés par HTLV-1 sont défectueuses pour la production d'IFN- $\alpha$  (Hishizawa *et al.*, 2004).

De façon similaire à HTLV-1, des particules virales libres du VIH-1 induisent la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC via l'activation de TLR7. La production d'IFN- $\alpha$  par les pDC nécessite l'attachement et l'endocytose du VIH-1 mais pas d'infection productive (Beignon *et al.*, 2005). Néanmoins les lymphocytes T CD4+ infectés par le VIH-1 induisent la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC de façon plus efficace que les particules virales libres après leur mise en contact avec de pDC. De façon intéressante, des lymphocytes T infectés par les pDC. Ainsi la production d'IFN- $\alpha$  par des pDC en contact avec des lymphocytes infectés par VIH-1 repose sur deux mécanismes : la reconnaissance de l'ARN viral dans les endosomes par TLR7 mais aussi l'activation de senseurs cytoplasmiques suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Lepelley *et al.*, 2011).

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

De même, les pDC ont la capacité de produire de l'IFN- $\alpha$  en réponse à une infection par le virus de l'hépatite C via un mécanisme original impliquant un contact avec des cellules infectées : le contact pDC-cellule infectée autorise le passage d'ARN viral de la cellule infectée vers la pDC via des exosomes. L'ARN viral active ensuite la voie TLR7 au sein de la pDC (Takahashi *et al.*, 2010, Dreux *et al.*, 2012).

Des pDC en contact avec HSV produisent de l'IFN- $\alpha$  par activation de la voie TLR9 sans être infectées de manière productive par le virus (Donaghy *et al.*, 2009). Enfin, EBV induit la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC via TLR9 (Quan *et al.*, 2010).

### Inhibition de la production des interférons de type I par les virus persistants à l'échelle cellulaire

Cependant des études montrent que les virus à infection persistante peuvent inhiber la production des interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) à différents niveaux. Ils peuvent réprimer l'expression des PRR, ils inhibent ou induisent la dégradation des intermédiaires des voies de signalisation aboutissant à l'activation des facteurs IRF-3 ou IRF-7 ; ils empêchent l'activation, la dimérisation ou la translocation de ces facteurs dans le noyau (Figure 25), (Vandevenne *et al.*, 2010, Meylan *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2005, Hasan *et al.*, 2007).

Certains mécanismes sont plus surprenants. Par exemple, le virus de l'hépatite C active la protéine PKR qui inhibe l'initiation de la traduction des ARNm via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eiF2 $\alpha$ . L'ARNm codant l'IFN- $\beta$  est notamment affecté tandis que la traduction de l'ARNm viral n'est pas diminuée par la phosphorylation de eiF2 $\alpha$  (Arnaud *et al.*, 2010). De la même façon, HTLV-1 induit l'expression d'une protéine cellulaire qui inhibe la production d'interféron de type I. L'induction de l'expression de SOCS1 par la protéine Tax via la voie NF-KB entraîne la dégradation de IRF-3 (Olière *et al.*, 2010, Charoenthongtrakul et al. 2011). Cependant, une étude contradictoire montre que dans une lignée de lymphocytes chroniquement infectés par HTLV-1, Tax1 induit l'activation de IRF-3. (Suzuki *et al.*, 2010). Dans cette dernière étude, l'activation de IRF-3 est analysée dans des cellules chroniquement infectées, exprimant fortement les protéines du virus, tandis que dans l'étude de Olière la dégradation de IRF-3 est observée dans des lymphocytes primaires transfectés avec le

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



## Figure 25 : Inhibition de la production des interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) par les virus persistants

Les virus persistants (dont les noms sont écrits en rouge et gras) inhibent la synthèse des IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  à différents niveaux. Ils codent des protéines virales (dont les noms sont écrits en rouge) qui directement ou indirectement via l'activation de protéines cellulaires inhibent l'expression des PRR (TLR ou RLR), répriment l'activation ou dégradent Myd88, IPS-1/MAVS, TBK1/IKK $\epsilon$ , inhibent la phosphorylation de IRF-3 et IRF-7 leur association en dimère et leur migration vers le noyau. Certaines protéines virales empêchent aussi le recrutement de facteurs de transcription sur le promoteur des gènes codant les IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ .

Senseurs du VIH-1	Mécanismes	Inhibition par le VIH-1
Trim5a	Reconnaissance de la	Pas d'inhibition décrite
Timba	capside virale	
Tetherine	Endocytose des particules	Dégradation et inhibition du
	virales bourgeonnant qui	transport de la tetherine à la
	sont alors reconnues par	membrane plasmique
	les TLR dans les	
	endosomes	

Tableau 7 : Exemples de senseurs particuliers du VIH-1 induisant une productiond'interférons de type I et mécanismes d'inhibition par le VIH-1

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

clone moléculaire de HTLV-1. Dans ce dernier système, l'expression du virus est certainement beaucoup plus faible que dans les lignées chroniquement infectées et n'est pas consécutive à une véritable infection.

VIH-1 présente des mécanismes particuliers permettant d'échapper aux senseurs qui lui sont spécifiques (Tableau 7). Par exemple Vpu, une protéine codée par le VIH-1 inhibe le transport de la tetherine à la membrane plasmique (Dube *et al.*, 2011) et induit une dégradation de la tetherine (Janvier *et al.*, 2011). De cette manière, Vpu contrecarre l'inhibition du relargage des particules virales et réprime la production d'interféron  $\beta$  induite par la tetherine.

L'inhibition de la production des interférons de type I n'est cependant pas immédiate et nécessite généralement l'expression de protéines virales non structurales ou cellulaires. De façon intéressante, le virus du sarcome de Kaposi (KSV) inhibe la production des interférons de type I lors d'une infection *de novo* avant même l'expression du génome viral. La protéine ORF45 faisant partie du tégument des particules virales, équivalent de la matrice, inhibe en effet l'activation du facteur de transcription IRF-7 (pour revue : Sathish *et* Yuan, 2011). Un autre aspect inédit de l'inhibition de la production d'interférons de type I par KSV est la synthèse de protéines virales homologues des IRF cellulaires. Par exemple, l'IRF-1 viral (v-IRF-1) de KSV interagit avec les co-facteurs de transcription CBP/p300 et empêche IRF-3 de recruter ces mêmes facteurs sur le promoteur du gène codant l'interféron  $\beta$ . Ainsi KSV déploie des mécanismes variés et originaux pour échapper à la production des interférons de type I (Figure 25), (pour revue : Sathish *et* Yuan, 2011).

Certains virus sont également dotés de mécanismes inhibant la production d'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Figure 25). De façon intéressante, le cytomégalovirus (CMV) inhibe la production d'interféron  $\alpha$  par les pDC avoisinantes. L'inhibition se fait par l'expression d'une protéine virale analogue à l'interleukine 10 humaine, cytokine anti-inflammatoire qui réprime les réponses immunitaires innées et adaptatives. La protéine virale analogue se fixe sur le récepteur de l'interleukine 10 sur les pDC, ce qui aboutit à l'inhibition de la production d'IFN- $\alpha$  (Chang *et al.*, 2010). La coculture de pDC non infectées et stimulées avec un agoniste du TLR9 avec des cellules infectées par le virus de la varicelle et du zona (VZV) inhibe la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Huch *et al.*, 2010). De façon analogue au CMV, le VZV

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

pourrait coder un facteur soluble qui inhiberait la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC avoisinantes. De la même manière, le virus de l'hépatite B (HBV) n'induit pas la production d'IFN- $\alpha$  par des pDC *in vitro*. HBV et plus précisément la protéine virale HBsAg inhibe la voie TLR9 des pDC (Xu *et al.*, 2009). Ainsi des patients chroniquement infectés par HBV et exprimant la protéine virale HBsAg ont des pDCs défectives pour la production d'IFN- $\alpha$ . Ce n'est pas le cas pour des patients séronégatifs pour la protéine HBsAg (Woltman *et al.*, 2011).

### • Qu'en est-il à l'échelle de l'organisme ?

La majorité des données montrant une production d'interférons de type I (IFN-I) d'une part, et l'inhibition de la production des IFN-I par les virus persistants d'autre part, est obtenue *in vitro*. Quel est le bilan à l'échelle de l'organisme ? L'inhibition de la production d'IFN-I l'emporte-t-elle sur l'induction de la synthèse d'IFN-I ?

Peu de données sont publiées concernant la production d'IFN-I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) chez les individus infectés par des virus de la famille des herpesviridae. Une étude n'observe pas d'augmentation de la concentration d'IFN- $\alpha$  dans du sérum de patients infectés par EBV et souffrants de mononucléose infectieuse (Hornef *et al.*, 1995). De même pour des patients infectés par le VZV (Ambrus *et al.*, 1989). Cependant, une production d'IFN-I sur le site de l'infection lors de la primo-infection ou lors des phases de réactivation ne peut pas être exclue (Figure 26). Une étude montre en effet une infiltration des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le derme au niveau de lésions génitales provoquées par une infection par HSV-1 (Donaghy *et al.*, 2009). Au contraire, lors des phases latentes, il est possible de supposer que la quantité d'IFN-I n'augmente pas (Figure 26). En effet, certains herpesviridae comme EBV ou CMV infectent jusqu'à 90% de la population : il est difficile d'imaginer que 90% de la population ait une production d'IFN-I accrue et persistante.

Des patientes infectées par différents types de papillomavirus et ayant des lésions précancéreuses au niveau du col de l'utérus ont une concentration d'IFN- $\alpha$  dans le plasma identique à des individus non infectés (Lazaranko et al., 2014). Une production d'IFN-I sur le site de l'infection n'est cependant pas exclue.

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



Centre dentifique plasmacytoide



Suite à la primo-infection, l'infection par des herpesviridae se manifeste par l'alternance de phases de latence généralement asymptomatiques et de phases de réactivation. Tandis qu'une production d'interférons  $\alpha$  et  $\beta$  par les cellules infectées ou les cellules dendritiques plasmacytoïdes avoisinantes lors de la primo-infection ou lors des phases de réactivation n'est pas exclue, il est plus difficile d'imaginer une production d'interférons lors des phases latentes.

Chez des chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite B (HBV), l'expression de deux groupes de gènes est suivie plusieurs semaines après l'infection dans les foies des chimpanzés infectés. Le premier groupe correspond à des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée, le second dans la réponse immunitaire adaptive. De façon étonnante, la primo-infection par HBV n'induit pas l'expression de gènes du premier groupe (Wieland *et al.*, 2004). Dans une autre étude, des cellules de foie de souris sont isolées et stimulées par des agonistes des TLR 1 à 9 en présence ou absence de virions de HBV, de surnageants de culture d'hépatocytes chroniquement infectés par HBV ou des protéines virales HBsAg ou HBeAg. Cette étude montre que HBV inhibe la production d'IFN-I normalement induite par la stimulation des TLR (Wu *et al.*, 2009). Une hypothèse qui pourrait permettre d'expliquer l'échappement d'HBV à la reconnaissance par les PRR serait la réplication de l'ADN viral, qui aurait lieu au sein de la capside virale dans la cellule infectée. Ce mécanisme pourrait s'additionner à l'inhibition des acteurs des voies de production de l'IFN-β par des protéines virales (pour revue : Busca *et al.*, 2014). Par

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

ailleurs, des cellules mononucléaires de sang périphérique de patients chroniquement infectés par HBV ont une production d'IFN- $\alpha$  défectueuse (Duan *et al.*, 2005). Ainsi il semblerait que l'inhibition de la production d'IFN-I l'emporte dans le cas d'une infection par HBV (Figure 27).



## Figure 27 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le virus de l'hépatite B

La production d'interférons  $\alpha$  et  $\beta$  semble être inhibée par le virus de l'hépatite B que ce soit lors de la primo-infection (cellule verte) ou lors de l'infection chronique (cellule bleue). De plus, les cellules dendritiques plasmacytoïdes du sang périphérique de patients chroniquement infectés sont défectueuses pour la production d'interféron  $\alpha$ .

Au contraire, l'analyse de l'expression des gènes dans des biopsies de foie de chimpanzés après une infection aiguë par le virus de l'hépatite C (HCV) montre une très forte expression de gènes de réponse à l'interféron (ISG), (Su *et al.*, 2002). De même, des chimpanzés atteints d'une infection chronique par HCV ont un taux d'expression élevé de nombreux ISG : 30% des gènes surexprimés sont des ISGs connus, ce qui suggère une activation persistante de la voie IFN-I (Bigger *et al.*, 2004). Chez des patients chroniquement infectés par HCV, une surexpression des ARNm de plusieurs gènes de réponse à l'interféron (ISG) comme MxA, PKR, 2'5'OAS et ISG15 est également détectée (MacQuillan *et al.*, 2003). Comment concilier la persistance de l'expression des ISG avec l'inhibition de la synthèse d'IFN-I par des protéines de HCV ? Des peptides issus du clivage de MAVS sont détectés dans des biopsies de foie de patients infectés par HCV montrant que l'inhibition de la synthèse d'IFN-I est effective dans les hépatocytes infectés *in vivo*. La synthèse d'IFN-I pourrait reposer *in vivo* sur les hépatocytes nouvellement infectés avant l'expression des protéines virales d'une part, et d'autre part

sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes en contact avec des hépatocytes infectés (Figure 28).



## Figure 28 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le virus de l'hépatite C

Chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite C, II y a une surexpression de plusieurs gènes de réponses à l'interféron et la présence de peptides issus du clivage de MAVS montrant qu'il y a à la fois induction de la réponse IFN-I et inhibition de la synthèse d'IFN-I. Les IFN-I pourraient être synthétisés par les cellules nouvellement infectées (cellule verte) avant l'expression des protéines virales et par les cellules dendritiques plasmacytoïdes en contact avec les cellules infectées tandis que la production d'IFN-I serait inhibée dans les cellules infectées (cellule bleue).

Chez des macaques infectés par SIV, homologue simien du VIH, une grande quantité d'ARNm codant les IFN-I persiste au cours de l'infection notamment dans les organes lymphoïdes (Abel *et al.*, 2002). Chez l'Homme, la concentration d'IFN-I augmente dans les stades tardifs de la maladie : des taux anormalement élevés de l'ordre de 250 à 1500 U/mL d'IFN-I sont détectés chez des patients en phase SIDA (Buimovici-Klein *et al.*, 1983). De plus, des études transcriptomiques réalisées à partir des ARN extraits de lymphocytes T CD4+ de patients infectés par le VIH-1 montrent une surexpression des gènes de réponse à l'interféron (Rotger *et al.*, 2010). Comment expliquer la persistance après la primo-infection d'une forte réponse IFN-I *in vivo* ? A ma connaissance, aucune étude, *in vitro* ou *in vivo*, ne montre l'inhibition de la production d'IFN-I par TRIM5 $\alpha$  dans les lymphocytes infectés. La production d'IFN-I par les cellules infectées pourrait être envisageable chez les patients infectés lors de la phase chronique et la phase SIDA. De plus, comme pour HCV, les lymphocytes T CD4+ nouvellement infectés et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) en contact avec des lymphocytes infectés pourraient être à l'origine de la production d'IFN-I *in vivo* (Figure 29). Concernant les pDC, une étude

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

montre que la tetherine est un ligand du récepteur ILT7 exprimé par les pDC. L'interaction tetherine-ILT7 exerce un rétro-contrôle négatif sur la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Cao *et al.*, 2009). Or la protéine virale Vpu du VIH-1 inhibe le transport de la tetherine à la membrane plasmique et dégrade la tetherine. Ainsi la diminution d'expression de la tetherine à la surface des cellules infectées pourrait être à l'origine d'une surproduction d'IFN- $\alpha$  par les pDC. Cependant, chez des patients infectés par le VIH-1 et en phase SIDA, le taux de pDC est réduit (Soumelis *et al.*, 2001). Ce mécanisme ne serait pas valable au cours des phases tardives de l'infection. Un autre mécanisme pouvant être à l'origine d'une réponse IFN-I persistante est la détérioration de la muqueuse intestinale du fait de la déplétion des lymphocytes T CD4+ infectés au niveau de la barrière intestinale. La détérioration de la muqueuse se traduit par la translocation de produits microbiens de la lumière intestinale vers la circulation sanguine (pour revue : Klatt *et al.*, 2013). En effet, une forte concentration de LPS est détectée dans le plasma des patients infectés par le VIH-1. Or le LPS est reconnu par le TLR4 et pourrait induire une production d'IFN-I chez les patients.



# Figure 29 : Modèle hypothétique concernant la production d'interférons de type I ( $\alpha$ et $\beta$ ) à l'échelle de l'organisme lors d'une infection par le VIH-1

La réponse interférons de type I semble être persistante lors d'une infection par le VIH-1. La production d'interférons par les cellules infectées n'est pas exclue. De plus, les cellules nouvellement infectées et les cellules dendritiques plasmacytoïdes peuvent être à l'origine de la production d'IFN-I. D'autre part la translocation microbienne au niveau de la barrière intestinale peut être responsable d'une production d'IFN-I persistante.

En conclusion, très peu de données permettent de conclure définitivement sur la production d'interférons de type I à l'échelle de l'organisme lors d'infections virales persistantes. Les modèles que j'ai établis des figures 26 à 29 sont hypothétiques. Il

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

apparait cependant que la production d'IFN-I à l'échelle de l'organisme est variable en fonction des virus : le bilan est variable pour les virus de la famille des herpesviridae avec une production possible lors de la primo-infection et des phases de réactivation ; le virus de l'hépatite B semble inhiber la production d'IFN-I, tandis que le virus de l'hépatite C et VIH-1 semble induire une production persistante d'IFN-I.

# 3. Quel est l'effet des interférons de type I sur la réplication des virus persistants ?

### Inhibition de la réplication des virus persistants par l'expression des gènes de réponse à l'interféron à l'échelle cellulaire

La libération d'interféron de type I par une cellule induit la transcription de gènes de réponse à l'interféron (ISG) par la cellule libérant l'interféron et par les cellules avoisinantes. Il existe plus de 100 ISG pouvant inhiber la réplication des virus à différentes étapes du cycle viral. A titre d'exemple, IFITM1 inhibe l'entrée d'HCV. Récemment Mx2 a été identifié comme un inhibiteur des étapes précoces du cycle viral de VIH-1 : Mx2 reconnait la capside virale et inhibe l'import nucléaire (Kane et al., 2013, Goujon et al., 2013). La RNAse L, activée par les 2'5' oligoadénylates synthétisés par la OAS1, clive les ARN simple brin dont le génome viral de HCV. La viperine bloque la réplication de HCV. De la même manière IFIT1 bloque la traduction des ARN viraux de HCV en inhibant le facteur d'initiation eiF3 (pour revue : Horner et al., 2013). IFIT1 inhibe aussi la réplication de HPV en séquestrant la réplicase virale E1 (Terenzi et al., 2008). Ainsi un même ISG peut inhiber la réplication de différents virus en employant des mécanismes distincts. La tetherine bloque le relargage des particules du VIH-1 en absence de la protéine virale Vpu (Neil et al., 2008, Van Damme et al., 2008) et des particules virales de HTLV-1 (Feng et al., 2003, Jouvenet et al., 2009). Cependant HTLV-1 est moins affecté par l'activité de la tetherine en se propageant par un contact cellulecellule (llinskaya et al., 2013).

### Inhibition par les virus persistants des fonctions médiées par les interférons de type l à l'échelle cellulaire

Les virus provoquant des infections persistantes inhibent les différents acteurs de la voie de signalisation Jak/STAT induite par les interférons de type I, soit directement, soit en activant l'expression d'inhibiteurs de la voie (Tableau 8).

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

Virus (protéines virales impliquées)	Cibles	Mécanismes	Références
EBV (LMP2A, LMP2B)	IFNAR1- IFNAR2	Dégradation	Shah <i>et al</i> ., 2009
CMV (IE1)	STAT1 STAT2	Relocalisation au niveau des corps PML	Paulus <i>et al</i> ., 2006
KSV (RIF), HPV (E6)	Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2	Inhibition de la phosphorylation	Bisson <i>et al.</i> , 2009 Li <i>et al</i> ., 1999
HSV-1 (ICP27)	STAT1	Inhibition de la phosphorylation et de la translocation dans le	Johnson <i>et al</i> ., 2008
HBV (Pol)		noyau	Chen <i>et al</i> ., 2013
HHV-6 B (IE1)	STAT1	Séquestration	Jaworska <i>et al</i> ., 2010
HPV (E7)	IRF-9	Inhibition de la translocation dans le noyau	Barnard <i>et al</i> ., 2000
HCV (core)	STAT1	Inhibition corrélée à l'activation de l'expression de SOCS3	Bode <i>et al</i> ., 2003
HTLV-1 (?)	STAT1, Tyk2	Inhibition de la phosphorylation	Feng <i>et</i> Ratner, 2008
HTLV-1 (Tax1)	STAT2	Compétition pour le recrutement de CBP/p300	Zhang <i>et al</i> ., 2008

Tableau 8 : Exemples de protéines virales codées par des virus persistants inhibantla voie de signalisation des interférons de type I et mécanismes associés

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

*In vitro* il a été montré que la majorité des virus, dont les virus persistants, inhibent différents gènes de réponse à l'interféron (ISG) par des mécanismes variés. Les protéines virales inhibent l'activation et/ou l'activité des ISG. Prenons l'exemple de PKR. La liaison d'ARN à caractère double brin à la protéine PKR induit l'autophosphorylation et la dimérisation de la protéine. Une fois phosphorylée, la protéine est activée. Son principal rôle consiste en l'inhibition de la traduction des ARNm viraux : PKR phosphoryle et inactive le facteur d'initiation de la traduction eiF2 $\alpha$  (Figure 30).

La protéine TRS1 du cytomégalovirus (CMV) se lie à PKR via son extrémité Cterminale. TRS1 séquestre PKR dans le noyau sous sa forme non phosphorylée, donc non active. PKR ainsi séquestrée dans le noyau n'inhibe pas le facteur d'initiation de la traduction eiF2 $\alpha$  et autorise la traduction des ARNm viraux dans le cytoplasme (Figure 30), (Hakki *et al.*, 2006). D'autre part l'extrémité N-terminale de TRS1 lie les ARN double brin qui normalement activent PKR. Ainsi PKR entre en compétition avec TRS1 pour la fixation des ARN double brin, ce qui diminue l'activation de la protéine antivirale (Figure 30), (Bierle *et al.*, 2013).

Dans des cellules cervicales cancéreuses de patients infectés par HPV, la localisation de la protéine PKR est modifiée. La protéine E6 de HPV relocalise la protéine PKR dans les P-bodies, inhibant ainsi son activation (Figure 30), (Hebner et al., 2006). HSV-1 inhibe l'activité de PKR en aval en induisant le déphosphorylation de eif $2\alpha$ . eif $2\alpha$ déphosphorylé peut ainsi initier la traduction des ARNm viraux (Figure 30), (He et al., 1997). Différents mécanismes inhibent PKR au cours d'une infection par le VIH-1. La protéine virale Tat inhibe PKR de trois manières différentes (Figure 30) : Tat se lie à PKR et inhibe directement l'autophosphorylation de la protéine. Tat séquestre des ARN double brin nécessaire à l'activation de PKR. De plus Tat a un domaine homologue à un motif de eif $2\alpha$  et entre ainsi en compétition avec le substrat de PKR. A la différence des exemples précédents, VIH-1 induit aussi des protéines cellulaires réprimant PKR. Au cours de l'infection par VIH-1, l'expression de la protéine ADAR1, connue pour éditer les ARN double brins, est augmentée dans les lymphocytes. ADAR1 se lie à PKR et inhibe l'activation de la protéine (Figure 30). Les ARNm du VIH-1 présentent à leur extrémité 5' une structure tige-boucle appelée TAR qui active PKR. La protéine cellulaire TRBP se fixe sur la structure TAR des ARNm viraux. De cette manière TRBP induit une diminution de l'activation de PKR (pour revue : Clerzius et al., 2011).

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



### Figure 30 : Exemples d'inhibition de la protéine PKR par les virus persistants

L'expression de la protéine PKR est induite par les interférons de type I. En présence d'ARN à structure double brin, la protéine se dimérise et est activée par auto-phosphorylation. Une fois activée, PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction elF-2 $\alpha$ . Des protéines virales ou des protéines cellulaires activées lors d'infections virales inhibent l'activation et l'activité de PKR.

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

En plus d'une inhibition directe des ISG, certains virus sont capables de détourner à leur profit les fonctions de certains ISG.

De façon intéressante, la tetherine est incorporée dans les particules virales du cytomégalovirus (CMV) et stimule l'entrée du virus dans les cellules cibles, comme les monocytes. Ainsi la tetherine facilite l'infection par CMV (Viswanathan *et al.*, 2011).

Garaigorta et Chisari montrent que le virus de l'hépatite C (HCV) inhibe les fonctions médiées par les interférons de type I, en diminuant l'expression des gènes de réponse à l'interféron (ISG). Des cellules hépatiques sont infectées puis traitées à l'IFN- $\beta$  une fois l'infection établie. Dans ces conditions, le traitement à l'IFN- $\beta$  ne diminue pas l'expression des protéines virales. Tandis que l'IFN- $\beta$  augmente la transcription des ISG, la quantité des protéines MxA et ISG15 codées par des gènes de réponse à l'interféron est plus faible, suggérant une inhibition de la traduction des ISG. L'inhibition de la traduction dont celle des ISG est médiée par la protéine PKR. Ainsi l'activation de PKR par HCV induit une diminution de la synthèse protéique affectant l'expression des ISG (Figure 31). Une diminution de l'expression des ISG peut être à l'origine de la persistance de HCV (Garaigorta *et* Chisari, 2009).

L'interaction du récepteur des lymphocytes T CD8+ (TCR) avec le complexe CMH-I-peptide viral contribue à l'activation des lymphocytes T CD8+. Une étude récente montre que l'induction de l'expression de CMH-I par l'IFN- $\beta$  est diminuée dans des cellules infectées par HCV (Kang *et al.*, 2014). Les cellules infectées échappent ainsi à la reconnaissance des lymphocytes T CD8+. Ceux-ci, en lysant les cellules infectées, sont normalement les acteurs majeurs de la clairance de HCV. Etonnamment la diminution de l'induction de CMH-I n'est provoquée par aucune des protéines virales mais est dépendante de la réplication de l'ARN viral de HCV. La réplication de l'ARN viral dans les cellules infectées serait à l'origine de l'activation de la protéine PKR qui inhibe la traduction notamment des molécules de CMH-I (Kang *et al.*, 2014). Cependant, les études de Kang et de Garaigorta ne sont pas en adéquation avec le rôle inhibiteur décrit *in vitro* des protéines virales NS5A et E2 sur la protéine PKR (Figures 30 et 31). En effet, une surexpression *in vitro* de ces deux protéines inhibe l'activité de PKR (pour revue : Horner *et* Gale, 2009). Néanmoins, l'inhibition de PKR par E2 et NS5A est discutée notamment du fait de l'absence de données *in vivo* (pour revue : Dabo *et* Meurs, 2012).

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



## Figure 31 : Modèle hypothétique conciliant les rôles ambivalents de la protéine PKR lors d'une infection par le virus de l'hépatite C

Partie gauche : Au cours d'une infection par HCV, la protéine PKR est activée. PKR inhibe alors la traduction des ARNm codant les gènes de réponse à l'IFN-I. Il en résulte une augmentation de la réplication de HCV et des protéines NS5A et E2. Partie droite : Les protéines NS5A et E2 fortement exprimées pourraient alors inhiber l'activation de PKR. L'expression des gènes de réponse à l'IFN-I n'est plus réprimée. La réplication de HCV serait inhibée et le taux de NS5A et E2 diminuerait (retour à la partie gauche). Ce modèle est hypothétique : l'inhibition de l'activation de PKR par E2 et NS5A est démontrée *in vitro* mais est discutée du fait du manque de données *in vivo* (pour revue : Dabo et Meurs, 2012).

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

De plus certains résultats sont contradictoires : par exemple la protéine E2 est essentiellement localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique tandis que PKR présente une localisation majoritairement cytoplasmique. L'interaction entre les protéines PKR et NS5A mise en évidence par double hybride n'a pas été confirmée dans une lignée cellulaire humaine suite à l'induction de l'expression des protéines du virus de l'hépatite C (pour revue : Dabo *et* Meurs, 2012). Comment concilier cependant la répression de l'expression des gènes de réponse à l'interféron (ISG) et de l'interféron  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) par la protéine PKR lors de l'infection par HCV et la potentielle inhibition de PKR par les protéines virales E2 et NS5A ? On pourrait imaginer que HCV, via l'activation de PKR, inhibe l'expression des ISG et de l'IFN- $\beta$ . L'inhibition de l'expression des ISG et de l'IFN- $\beta$  autoriserait une forte expression des protéines virales dont E2 et NS5A. E2 et NS5A exprimées fortement pourraient inhiber PKR et permettre l'expression des ISG : les protéines E2 et NS5A exerceraient alors un rétrocontrôle négatif sur l'action pro-virale de PKR (Figure 31).

### • Les interférons de type l, un effet bénéfique ou délétère pour l'organisme lors des infections virales persistantes ?

Une mutation homozygote du gène codant la protéine STAT1, impliquée dans la voie de signalisation des interférons de type I (IFN-I), s'avère mortelle lors d'infections par des herpesvirus comme CMV, HSV-1 et EBV (Dupuis *et al.*, 2003). Un contrôle par les IFN-I est donc nécessaire pour le maintien d'une infection persistante, sans issue fatale, par ces différents herpesvirus. Une expression réduite des TLR est un marqueur de la persistance de l'infection tandis qu'une surexpression des TLR est généralement associée à une élimination du papillomavirus chez les patients (Daud *et al.*, 2011). Les IFN-I sont souvent utilisés pour traiter les patients infectés chroniquement par HVC, HBV, HPV ou par des herpesvirus. Le traitement des patients chroniquement infectés par HCV à l'aide d'IFN- $\alpha$  et de ribavirine, un analogue nucléosidique de la guanosine, est efficace dans 40 à 50% des cas (Fried *et al.*, 2004). L'IFN- $\alpha$  est également le premier traitement recommandé pour des patients chroniquement infectés par HBV (Perrillo *et al.*, 2009), ce qui suggère un contrôle de l'infection virale par la réponse IFN-I.

Une étude a comparé des cellules de patients infectés par HTLV-1 et atteints de l'ATL à celles d'individus infectés mais asymptomatiques (Hishizawa *et al.,* 2004). Cette

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

étude montre que le nombre absolu de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans le sang périphérique des patients ATL est significativement plus faible que pour les patients asymptomatiques. De plus il y a une corrélation négative entre la charge provirale des individus asymptomatiques et la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Hishizawa *et al.,* 2004). De même un nombre réduit de pDC dans le sang est observé chez deux patients infectés par HSV-2 et ayant développé des symptômes sévères liés à l'infection (Dalloul *et al.,* 2004). L'ensemble des ces études montre l'importance de la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC au cours des infections virales chroniques.

Comment expliquer que les IFN-I puissent contrôler les infections virales malgré l'inhibition de la voie de signalisation des IFN-I et des ISG par des protéines virales ? Les IFN-I pourraient avoir un effet sur les cellules cibles des virus qui ne sont pas encore infectées alors que l'effet antiviral des IFN-I serait inhibé dans les cellules déjà infectées. Ainsi les IFN-I pourraient bloquer la transmission des virus d'une cellule infectée à une cellule cible. De cette manière, les IFN-I seraient directement impliqués dans la persistance des infections. A ce titre, une étude récente montre un transfert de molécules antivirales induites par l'IFN- $\alpha$  d'une cellule non infectée vers une cellule infectée par HBV via des exosomes. Ce mécanisme contourne l'inhibition des voies de signalisation de l'IFN-I dans les cellules infectées (Li *et al.*, 2013).

Cependant, comme évoqué dans la partie IV.2, une signature IFN-I caractérisée par l'expression persistante de certains ISG est associée au développement de la HAM/TSP chez des patients infectés par HTLV-1 (Tattermusch *et al.*, 2012). Un effet délétère des IFN-I est aussi observé lors d'infections pat le VIH-1, HCV ou HPV.

Un traitement combinant l'IFN- $\alpha$  à la ribavirine est peu efficace chez les patients chroniquement infectés par HCV qui présentent un fort taux d'ISG suggérant une forte production d'IFN-I avant le traitement. Cette forte réponse IFN-I serait responsable d'une expression accrue d'inhibiteurs de la voie de signalisation des IFN-I comme USP18 qui se lie au récepteur IFNAR et empêche le recrutement de Tyk2 et Jak1 (Makowska *et* Heim 2012). Ainsi une production d'IFN-I chronique importante serait à l'origine de l'émergence de cellules infectées résistantes à un traitement à l'IFN- $\alpha$ .

Un phénomène d'émergence de cellules résistantes à l'IFN- $\beta$  est observé de façon similaire pour des cellules infectées par HPV (Figure 32). Des kératinocytes sont infectés par HPV-31. Les cellules infectées sont ensuite traitées à l'IFN- $\beta$ . Le traitement est

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

efficace durant les trois premiers jours avec une diminution du nombre de cellules infectées mais est à l'origine de l'apparition de cellules infectées résistantes à l'IFN- $\beta$  10 à 14 jours après le début du traitement (Chang *et al.*, 2002). Une étude plus récente utilise une lignée cellulaire établie à partir d'épithélium cervical humain naturellement infecté par HPV-16. Le traitement de ces cellules avec de l'IFN- $\beta$  induit l'émergence de cellules infectées résistantes au traitement (Herdmann *et al.*, 2006).

Durant les phases initiales de l'infection par HPV, le génome viral est présent dans le novau sous forme d'épisomes (Figure 32.A). Il arrive que le génome viral s'intègre par la suite dans le génome de la cellule hôte (Figure 32.B). L'intégration concerne notamment les gènes codant les protéines oncogènes E6 et E7 mais pas le gène codant la protéine E2 qui régule l'expression virale. Ce dernier est maintenu sous forme épisomale. L'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte est une étape-clé dans la progression de l'infection vers un cancer cervical. Dans les deux études évoquées précédemment, les cellules résistantes à l'IFN-β ont un nombre d'épisomes réduit. L'IFN- $\beta$ , en réduisant le nombre d'épisomes, supprime l'expression du régulateur viral E2 entrainant ainsi une augmentation de l'expression des oncogènes E6 et E7 dans les cellules où les gènes codant ces deux protéines sont intégrés dans le génome cellulaire (Figure 32.C), (Herdmann et al., 2006). Plus récemment il a été montré que l'expression de la protéine IFIT1 cellulaire était induite par les IFN-I dans des cellules infectées par HPV. IFIT1 induit une translocation de la protéine virale E1 du noyau vers le cytoplasme. Or E1 est nécessaire à la réplication des épisomes viraux dans le noyau. Ainsi cette étude explique comment l'IFN- $\beta$  induit une perte des épisomes viraux via l'induction de IFIT1 (Terenzi et al., 2008). De façon intéressante, la protéine E5 de HPV16 exprimée grâce à un plasmide dans des kératinocytes induit la synthèse d'IFN-β et d'ISG (Muto et al., 2011). En induisant la synhtèse d'IFN- $\beta$ , la protéine E5 pourrait participer in vivo à l'émergence de cellules résistantes.

La réponse IFN-I paraît néfaste *in vivo* lors de l'infection par VIH-1. Nous avons déjà évoqué que la concentration d'IFN- $\alpha$  dans le plasma des patients augmente avec la progression de l'infection vers la phase SIDA. Suite à ces découvertes, des anticorps anti-IFN- $\alpha$  ont été administrés à des patients infectés par le VIH-1 entrainant une stabilisation du taux de lymphocytes T CD4+ (Fall *et al.*, 1995). En 2010, une étude a comparé la réponse IFN-I lors de l'infection par SIV-1, l'équivalent simien de VIH, chez le sooty

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



 Cellules infectées par HPV en présence d'IFN-β Prolifération des cellule infectées avec les gènes E6 et E7 intégrés dans le génome cellulaire

# Figure 32 : Implication de l'IFN- $\beta$ dans la progression d'une infection par HPV vers un cancer cervical

(A) Durant les étapes initiales de l'infection, le génome est présent sous forme épisomale dans le noyau. (B) Il arrive qu'une partie du génome viral, notamment les gènes codant les protéines oncogènes E6 et E7 s'intègrent dans le génome cellulaire. L'expression des gènes E6 et E7 est alors réprimée via l'action du gène E2 maintenu sous forme épisomale. (C) La protéine IFIT1 induite par l'IFN- $\beta$  inhibe la protéine virale E1 nécessaire à la réplication des épisomes. En induisant la perte des épisomes, l'IFN- $\beta$  sélectionne les cellules où les gènes E6 et E7 sont intégrés dans le génome cellulaire. L'expression des protéines oncogènes E6 et E7 n'est alors plus réprimée par E2.

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

Mangabey et le Macaque rhésus. L'infection par SIV-1 n'induit pas de maladie chez le Mangabey qui est un hôte naturel du virus. Au contraire, l'infection du Macague rhesus provoque une maladie progressant de façon similaire à celle développée par l'Homme infecté par le VIH-1. La phase aiguë de l'infection est associée à une réponse IFN-I forte et transitoire à la fois chez le Mangabey et chez le Macaque rhésus. Cette réponse IFN-I repose notamment sur la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC. Mais contrairement au Mangabey, le Macaque rhésus montre une réponse IFN-I qui persiste aussi au cours de la phase chronique, de façon similaire à l'Homme (Harris et al., 2010). Cette étude montre qu'une réponse IFN-I persistante au cours de la phase chronique est associée à la progression de la maladie. Une hypothèse associe une production chronique d'IFN- $\alpha$  par les pDC à la diminution du taux de lymphocytes T au cours de la maladie (Figure 33). La production d'IFN- $\alpha$  par les pDC induit l'expression par les monocytes et les lymphocytes de la protéine TRAIL. D'autre part, VIH-1 induit l'expression du récepteur de TRAIL, DR5, sur les lymphocytes T CD4+. L'interaction entre TRAIL et son récepteur induit l'apoptose des lymphocytes T CD4+ (pour revue : Herbeuval et Shearer, 2007). Par ailleurs, l'infection chronique par le VIH-1 est associée à un dysfonctionnement du thymus, avec notamment une diminution de la prolifération des précurseurs des lymphocytes T (Dion et al., 2004). Une étude récente montre que l'IFN- $\alpha$  simien inhibe la prolifération de thymocytes différenciés et de lymphocytes naïfs (Dutrieux et al., 2014). Cette étude suggère que l'IFN- $\alpha$  produit chroniquement au cours d'une infection par le VIH-1 ou SIV-1 pourrait être à l'origine du dysfonctionnement thymique. Ainsi plusieurs hypothèses soutiennent que la réponse IFN- $\alpha$  est directement impliquée dans le développement du SIDA.

La persistance de la réponse IFN-I au cours d'une infection virale par LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire), a été étudiée chez la souris (Wilson *et al.*, 2013). Des souris sont infectées par deux souches du LCMV, l'une provoquant une infection aiguë, l'autre responsable d'une infection persistante. L'infection chronique par LCMV induit une réponse immunosuppressive persistante caractérisée par exemple par une surexpression de l'interleukine-10 qui réprime les réponses immunitaires innée et adaptative. Une réponse IFN-I persistante est à l'origine de la réponse immunosuppressive. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN-I entraîne une diminution de l'inflammation chronique due à l'infection persistante. De façon originale, les

V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes



# Figure 33 : Implication de l'interféron $\alpha$ produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'apoptose des lymphocytes T CD4+ chez des patients infectés par VIH-1

Au cours d'une infection par le VIH-1, l'IFN- $\alpha$  produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes induit l'expression de TRAIL par les lymphocytes ou les monocytes. D'autre part VIH-1 induit l'expression de DR5, le récepteur de TRAIL par les lymphocytes T CD4+. L'interaction de TRAIL avec DR5 induit l'apoptose des lymphocytes T CD4+.

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

souris sont traitées par un anticorps anti-IFNAR1 avant l'infection par la souche de LCMV persistante. Chez ces souris, le titre viral 30 jours après l'infection est plus faible que chez des souris infectées non traitées par l'anticorps anti-IFNAR1. Au contraire, l'inhibition de la voie IFN-I chez des souris infectées avec la souche virale induisant une infection aiguë induit une infection virale persistante. Dans ce cas-là, la réponse IFN-I est nécessaire pour contrôler l'infection. Cette étude met en valeur l'ambivalence du rôle de l'IFN-I, avec un effet antiviral lors des phases aiguës d'une infection, et un effet immunosuppresseur néfaste en cas d'activation chronique.

### 4. Modèle reliant l'effet des interférons de type l aux pathologies induites par des infections virales persistantes

### • Le rôle des interférons de type I dans la persistance de l'infection

Comme le montre l'étude de Wilson (Wilson *et al.*, 2013), les interférons de type l ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont nécessaires pour contrôler les phases aiguës d'une infection via leur action antivirale. Il est possible d'imaginer que rapidement après l'expression des protéines virales, les cellules infectées bloqueraient la production et les fonctions médiées par les IFN-I tandis que l'action antivirale des IFN-I resterait effective sur les cellules non infectées. Ainsi l'action antivirale des IFN-I et l'échappement des cellules infectées à la réponse IFN-I seraient impliqués dans la persistance des infections virales (Figure 34). Cependant, ce modèle hypothétique n'est valable que dans le cas où une production d'IFN-I persiste durant l'infection.

De façon originale, certains virus, au lieu d'échapper à la réponse IFN-I déploient des mécanismes de coopération. Au cours d'une infection par l'herpesvirus de souris MHV 68, le taux d'IFN-I augmente rapidement après l'infection, induisant l'expression de IRF-2. IRF-2 est codé par un gène de réponse à l'interféron et réprime la voie de signalisation des IFN-I. De cette manière IRF-2 effectue un rétro-contrôle négatif sur la réponse IFN-I. Un ISRE, séquence de réponse à l'IFN-I qui lie les facteurs IRF, est présent au sein d'un intron d'un gène viral codant pour la protéine M2. IRF-2 se lie sur l'ISRE viral et réprime l'expression de la protéine M2. Or M2 est nécessaire à la réactivation du virus dans les lymphocytes B infectés. Ainsi via la réponse IFN-I induisant IRF-2 qui réprime ensuite l'expression de la protéine W2, MHV 68 est maintenu en phase latente dans les lymphocytes B (Mandal *et al.*, 2011). EBV et KSV présente aussi

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

des séquences ISRE dans leurs génomes, sur lesquelles se lient des IRF. Le rôle ce ces séquences n'a pas été étudié *in vivo* mais un mécanisme similaire de coopération avec la réponse IFN-I pourrait être envisagé (Zhang *et al.*, 1997, Ning *et al.*, 2003).



**Figure 34 : Le rôle des interférons de type I dans la persistance d'une infection virale** Une balance entre l'inhibition de l'infection *de novo* de cellules en contact avec des cellules infectées et l'inhibition de la réponse IFN-I par les cellules infectées pourrait être impliquée dans la persistance d'une infection virale.

### Implication d'une activation chronique de la voie des interférons de type I dans les pathologies

L'étude de Wilson (Wilson *et al.*, 2013) met en évidence un rôle ambivalent des IFN-I (Figure 35). Une activation transitoire de la voie de signalisation IFN-I permet le contrôle d'une infection virale via les propriétés antivirales des gènes de réponse à l'interféron et l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Ainsi le contrôle des infections virales aiguës repose en partie sur la réponse IFN-I. Les infections provoquées par des herpesviridae peuvent s'apparenter à des infections aiguës lors des primo-infections et des phases de réactivation. On peut supposer alors que l'IFN-I participe au contrôle de ces phases où les virus sont exprimés.

### V. Modèle liant l'effet des interférons aux pathologies induites par des infections virales persistantes

Une activation persistante de la voie IFN-I serait à l'origine d'une réponse immunosuppressive prolongée participant d'une part à la persistance de l'infection et d'autre part au développement de pathologies comme le SIDA ou de pathologies inflammatoires comme la HAM/TSP. De plus, nous avons mis en évidence dans la partie précédente qu'une activation chronique de la voie IFN-I participait à l'émergence de cellules résistantes dans le cas d'une infection chronique par HCV et par HPV. Ainsi la réponse IFN-I est directement impliquée dans le développement de pathologies lors d'infections virales persistantes.



Figure 35 : Rôle ambivalent des interférons de type I et modèle d'implication de la réponse interféron de type I dans les pathologies associées aux infections virales persistantes

Une production transitoire d'IFN-I lors d'une infection aiguë ou d'une phase de réactivation de l'expression virale dans le cas des herpesviridae participerait au contrôle de l'infection via l'inhibition de la réplication virale. Au contraire une production persistante des IFN-I lors d'une infection chronique pourrait être à l'origine de la sélection de cellules résistantes, de la mise en place d'une réponse immunosuppressive et d'une inflammation chronique. (Inspiré des revues de Odorizzi *et* Wherry, 2013, Wilson *et* Brooks, 2013)

# PROBLEMATIQUE
### Problématique du travail de thèse

HTLV-1 et HTLV-2 sont des virus provoquant une infection persistante chez l'individu infecté. Ils partagent une forte homologie dans leur organisation génomique et leur séquence nucléotidique. De plus ces deux virus sont capables d'immortaliser des lymphocytes T humains en culture. Cependant l'infection par HTLV-2 n'est pas associée au développement de leucémie tandis que l'infection par HTLV-1 induit chez 2-7% des individus une leucémie grave, la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL). A ce jour, le mécanisme exact à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus n'est pas entièrement élucidé.

Un rôle ambivalent de l'IFN- $\alpha$  semble directement impliqué dans des pathologies liées à des infections virales persistantes comme le SIDA ou le cancer du col de l'utérus. Les données publiées concernant l'effet de l'IFN- $\alpha$  lors des infections par HTLV-1 sont contradictoires et très peu de données concernent le rôle de l'IFN- $\alpha$  au cours d'une infection par HTLV-2. Au cours de ma thèse j'ai essayé d'une part d'éclaircir le rôle de l'IFN- $\alpha$  dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2 et d'autre part de déterminer si l'IFN- $\alpha$  pouvait être impliqué dans la différence de pathogénicité observée entre les deux virus ?

Dans ce but, j'ai d'abord testé si l'IFN- $\alpha$  exerçait un contrôle distinct sur l'infection *de novo* de cellules T, cibles d'HTLV-1 et d'HTLV-2. J'ai montré que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection *de novo* de lymphocytes T par HTLV-1 et HTLV-2. Cette inhibition repose notamment sur l'activation de PKR qui réprime les étapes tardives du cycle viral. J'ai étudié plus précisément le rôle de la protéine ADAR1-p150 induite par l'IFN- $\alpha$  et exprimée dans les cellules cibles et les cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 sur la réplication des deux virus. La protéine ADAR1-p150, en inhibant l'activation de PKR, contrecarre l'effet inhibiteur de l'IFN- $\alpha$  sur l'infection par HTLV-1 et HTLV-2. Une balance entre l'activation de PKR et l'expression de ADAR1-p150 pourrait être impliquée dans la persistance des infections par HTLV-1 et HTLV-2. Dans un dernier temps, j'ai voulu déterminer si l'IFN- $\alpha$  a un effet distinct sur des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-1 et HTLV-2. J'ai montré que les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement à l'IFN- $\alpha$  contrairement à des cellules infectées par HTLV-2. Ces derniers résultats suggèrent qu'un rôle différent de l'IFN- $\alpha$  sur HTLV-1 et HTLV-2. pourrait être impliqué dans la différence de pathogénicité entre les deux virus.

# RESULTATS

## I. Article 1 : L'interféron $\alpha$ inhibe l'infection *de novo* par HTLV-1 et HTLV-2 via l'activation de PKR

Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation, Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, Journo C, Dutartre H, Mahieux R., J Virol. 2013 Dec;87(24):13386-96. doi: 10.1128/JVI.02758-13. Epub 2013 Oct 2.

### 1. Contexte de l'étude et principaux résultats

L'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) est un acteur majeur de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Il s'agit d'une cytokine sécrétée en majorité par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pour revue : Colonna *et al.*, 2004). La liaison de l'IFN- $\alpha$  à ses récepteurs cellulaires active la voie de signalisation Jak/STAT entraînant la transcription des gènes de réponse à l'interféron (ISG, interferon-stimulated genes) codant pour des protéines dont certaines possèdent une activité antivirale. Parmi ces protéines, PKR (dsRNA-dependant protein kinase R) est responsable de l'arrêt de la traduction des ARNm viraux et cellulaires via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction cellulaire eIF2 $\alpha$  (Su *et al.*, 2007).

Des essais cliniques consistant en l'administration d'IFN- $\alpha$ , seul ou combiné avec d'autres molécules (AZT, arsenic trioxide), ont été réalisés chez des patients ayant développé une ATL ou une HAM/TSP. L'IFN- $\alpha$ , en combinaison avec l'AZT, un inhibiteur de la transcriptase inverse virale, conduit à la rémission complète des patients souffrant des formes chronique et progressive de l'ATL (Bazarbachi *et al.*, 2010). En revanche, le traitement par l'IFN- $\alpha$  de patients HAM/TSP n'a conduit qu'à une diminution transitoire de la charge provirale sans bénéfice clinique (Saito *et al.*, 2004). De nombreuses études rapportent une résistance des cellules infectées par l'IFN- $\alpha$  malgré l'induction de l'expression de gènes de réponse à l'interféron (Bazarbachi *et al.*, 1999, El-Sabban *et al.*, 2000, Mahieux *et al.*, 2001, Nasr *et al.*, 2003, Moens *et al.*, 2012). Les bases moléculaires justifiant l'utilisation de l'IFN- $\alpha$  dans le contexte d'une infection par HTLV-1 restent donc largement inconnues. Par ailleurs, l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur une infection par HTLV-2 n'a pas été étudié.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet d'un traitement exogène à l'IFN- $\alpha$  sur les infections par HTLV-1 et HTLV-2. Etant donné que HTLV-1 et HTLV-2 se transmettent principalement via un contact cellule-cellule, nous avons mis au point un système d'infection *in vitro* reposant sur une co-culture de lymphocytes non infectés (Jurkat ou



lymphocytes primaires) avec des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Afin d'évaluer l'infection *de novo* des lymphocytes cibles, un plasmide reporteur codant la luciférase sous le contrôle des promoteurs LTR de HTLV-1 ou HTLV-2 est transfecté dans les cellules cibles avant l'étape de co-culture. L'expression de la luciférase dépend alors de l'activité transactivatrice de Tax1 et Tax2 sur le promoteur LTR. Ainsi la mesure de l'activité luciférase reflète l'infection des lymphocytes cibles, de l'entrée des virus à l'expression des protéines virales Tax1 et Tax2 puisque Tax n'est pas contenue dans la particule virale.

Nous avons montré qu'un traitement à l'IFN- $\alpha$  de lymphocytes non infectés inhibe l'infection par HTLV-1 et HTLV-2. L'effet inhibiteur d'un pré-traitement à l'IFN- $\alpha$  est également observé dans des 293T transfectées par des clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2. Nous avons précisé le mécanisme d'action de l'IFN- $\alpha$  en cherchant quelle(s) étape(s) du cycle viral étai(en)t inhibée(s). Nous avons observé que l'IFN- $\alpha$  n'a pas d'effet sur les étapes précoces du cycle viral. Au contraire, l'IFN- $\alpha$  inhibe les étapes tardives des cycles de HTLV-1 et HTLV-2 en réprimant la synthèse des protéines virales. L'inhibition de PKR restaure l'infection des lymphocytes cibles et l'expression des protéines virales dans les 293T transfectées par du clone moléculaire malgré un prétraitement à l'IFN- $\alpha$ . En conclusion, cette étude montre pour la première fois que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection *de novo* de lymphocytes cibles par HTLV-1 et HTLV-2 et que l'inhibition est médiée en majeure partie via l'activation de PKR. Ces résultats seront commentés dans la partie Discussion du manuscrit.

### 2. Article



# Alpha Interferon Restricts Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and 2 *De Novo* Infection through PKR Activation

Anne Cachat,<sup>a,b,c,d,e</sup> Sébastien Alain Chevalier,<sup>a,b,c,d,e</sup> Sandrine Alais,<sup>a,b,c,d,e</sup> Nga Ling Ko,<sup>f</sup> Lee Ratner,<sup>g</sup> Chloé Journo,<sup>a,b,c,d,e</sup> Hélène Dutartre,<sup>a,b,c,d,e</sup> Renaud Mahieux<sup>a,b,c,d,e</sup>

Equipe Oncogenèse Rétrovirale,<sup>a</sup> Equipe Labelisée Ligue Nationale Contre le Cancer,<sup>b</sup> and International Center for Research in Infectiology,<sup>c</sup> INSERM U1111-CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon,<sup>d</sup> and Université Lyon 1, LabEx ECOFECT-Eco-Evolutionary Dynamics of Infectious Diseases,<sup>e</sup> Lyon, France; Unité d'Épidémiologie et Physiopathoglogie des Virus Oncogenes, Institut Pasteur, Paris, France<sup>f</sup>; Division of Molecular Oncology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA<sup>g</sup>

Type I interferon (IFN-I) inhibits the replication of different viruses. However, the effect of IFN-I on the human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) viral cycle is controversial. Here, we investigated the consequences of IFN- $\alpha$  addition for different steps of HTLV-1 and HTLV-2 infection. We first show that alpha interferon (IFN- $\alpha$ ) efficiently impairs HTLV-1 and HTLV-2 *de novo* infection in a T cell line and in primary lymphocytes. Using pseudotyped viruses expressing HTLV-1 envelope, we then show that cell-free infection is insensitive to IFN- $\alpha$ , demonstrating that the cytokine does not affect the early stages of the viral cycle. In contrast, intracellular levels of Gag, Env, or Tax protein are affected by IFN- $\alpha$  treatment in T cells, primary lymphocytes, or 293T cells transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones, demonstrating that IFN- $\alpha$  acts during the late stages of infection. We show that IFN- $\alpha$  does not affect Tax-mediated transcription and acts at a posttranscriptional level. Using either small interfering RNA (siRNA) directed against PKR or a PKR inhibitor, we demonstrate that PKR, whose expression is induced by interferon, plays a major role in IFN- $\alpha$ -induced HTLV-1/2 inhibition. These results indicate that IFN- $\alpha$  has a strong repressive effect on the HTLV-1 and HTLV-2 viral cycle during *de novo* infection of cells that are natural targets of the viruses.

uman T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infects 5 to 10 million people worldwide (1). In 2 to 5% of infected individuals, HTLV-1 causes either adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) or a neurodegenerative disorder called HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (2–5). Interestingly, despite a high percentage of similarity in its genomic organization with HTLV-1, HTLV-2 has been associated with lymphocytosis and with rare cases of HAM/TSP (6), but not with leukemia (7–9), and the molecular determinants that would explain those differences are the subject of numerous investigations (for a recent review, see reference 10).

Innate immunity plays a critical role in the host response to a microbial infection. The interferon (IFN) family includes three classes, i.e., type I (IFN-I, including alpha interferon [IFN- $\alpha$ ] and IFN- $\beta$ ), type II (IFN- $\gamma$ ), and IFN- $\lambda$  molecules. IFN-I is rapidly induced following viral infections (11). Binding of IFN-Is to their receptors (IFNAR1/IFNAR2) initiates the Janus kinases-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) intracellular signaling pathway, leading to transcription activation of IFN-stimulated genes (ISGs) that are responsible for the antiviral, antiproliferative, and immunoregulatory responses (12).

ISGs target different steps of the viral life cycle (13, 14). As an example, simian tripartite interaction motif  $5\alpha$  (TRIM- $5\alpha$ ) targets incoming human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particles; apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) edits the HIV-1 genome during reverse transcription (RT) in the absence of Vif; 2'-5' oligoadenylate synthetase and RNase L are responsible for mRNA degradation in cases of dengue virus, chikungunya virus, or hepatitis C virus (HCV) infection; double-stranded RNA (ds-RNA)-activated serine/threonine protein kinase (PKR) prevents viral mRNA translation in cells infected with hepatitis B virus, HCV, or HIV; and

tetherin prevents HIV-1 particle release in cells infected with HIV-1 that does not encode the Vpu viral protein.

A study demonstrated that ultracentrifuged HTLV-1 particles induce IFN-I secretion after their incubation with plasmacytoid dendritic cells (15). In addition, an inverse correlation was described between the HTLV-1 proviral load (PVL) (i.e., the number of integrated copies of HTLV-1 expressed as a proportion of peripheral blood mononuclear cells [PBMCs]) and endogenous IFN- $\alpha$  secretion in ATLL patients (16), providing a rationale for IFN- $\alpha$  therapy in HTLV-1-infected individuals. Indeed, therapeutic treatments using IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , alone or in combination with other molecules, such as azidothymidine (AZT), have been performed in ATLL patients (17–22) or TSP/HAM patients (23–28). The most remarkable effects were observed in chronic and smoldering ATLL patients treated with IFN-AZT combined chemotherapy, where sustained and complete remission was reached and maintained after 14 years of observation in some patients (29). The same therapeutic combination also improved the survival time of acute ATLL patients, who eventually relapsed (29).

However, IFN- $\alpha$  effects on the HTLV-1 cycle *in vitro* are controversial. It was shown that HTLV-1 gag mRNA decreased when HTLV-1-immortalized (interleukin 2 [IL-2]-dependent) T cells were cocultured with human 293T or murine NIH 3T3 nonlymphoid stromal cells (30). This effect was abolished when a poly-

Received 23 September 2013 Accepted 25 September 2013 Published ahead of print 2 October 2013 Address correspondence to Renaud Mahieux, renaud.mahieux@ens-lyon.fr. Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.02758-13

clonal neutralizing antibody against IFN- $\beta$  (but not against IFN- $\alpha$ ) was added, indicating that IFN- $\beta$  produced by stromal cells could inhibit virus production. Consistent with those data, HTLV-1 expression was restored when HTLV-1-infected cells were separated from IFN-producing stromal cells. Finally, using a murine model, the authors concluded that the decrease in HTLV-1 expression *in vivo* was linked to the IRF-7-dependent pathway (30). In contrast, other reports showed that IFN- $\alpha$  treatment of HTLV-1-transformed cells does not lead to any significant reduction in virus expression (31–33), suggesting that the infected cells, which chronically produce viral proteins and do not require IL-2 for their growth, are insensitive to IFN-I.

IFN- $\alpha$  treatment of 293T cells transfected with an HTLV-1 molecular clone inhibited virus assembly and release (34). Subsequent reports showed that ectopically overexpressed tetherin (which can be induced by IFN) prevents the release of HTLV-1 virus-like particles (expressing only gag/pol) or HTLV-1 particles from 293T-transfected cells (35, 36). Importantly, those reports also showed that tetherin decreases only cell-free transmission of HTLV-1 and does not impact cell-cell transmission, which is the main route of HTLV-1 transmission (35, 37, 38). The experiments, however, did not address whether other steps of HTLV-1 infection were sensitive to IFN-I.

The effects of exogenous IFN-I addition on the HTLV-1 cycle are therefore debated (for recent reviews, see references 39 and 40) and have never been investigated for HTLV-2. In addition, most reports have been performed using transfected epithelial cells, which do not represent target cells *in vivo* and do not allow the study of the early steps of infection. Here, we used different infection settings to show that IFN- $\alpha$ -treated T cells are refractory to primary HTLV infection and that IFN- $\alpha$  targets the late stages of the viral cycle. We demonstrate that IFN- $\alpha$  inhibits viral protein expression through PKR activation, leading to a decrease of viral protein synthesis.

### MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** 293T and 293T-LTR-GFP (41) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies) and 100  $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin (Gibco, Life Technologies). Jurkat, Jurkat-LTR-luc (42), and HTLV-1-infected (C91-PL and C8166) and HTLV-2-infected (C19) T cell lines and peripheral blood lymphocytes (PBLs) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies). PBLs were purified from the blood of healthy donors and were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (1  $\mu$ g/ml; Sigma) and IL-2 (150 U/ml; Miltenyi Biotec) for 3 days. All cell lines were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. 293T-LTR-GFP and Jurkat-LTR-luc cells are stably transfected with a plasmid encoding green florescent protein (GFP) or luciferase (luc), respectively, under the control of the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) promoter.

**Plasmids.** The HTLV-1 proviral DNA clone (pACH) was previously described (43). The HTLV-2 proviral DNA clone (pH6neo) and the SV2Neo plasmids (44, 45) were provided by P. Green. The pCMVHT1-M (46) and the pCRU5-HT1GFPLuc (35) plasmids were provided by D. Derse. The pSG5M-Tax1, pSG5M-Tax2, and HTLV-1– or HTLV-2–LTR–luciferase plasmids were previously described (47).

**RNA extraction and real-time RT-PCR.** RNA was extracted using the RNA easy extract kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and resuspended in 30  $\mu$ l of water. Before reverse transcription, 500 ng of RNA was treated with 10 U of RNase-free DNase I (Qiagen) for 20 min at 27°C and then for 15 min at 60°C. Reverse transcription was then

performed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR (qPCR) was performed using FastStart Universal SYBR green Master (Roche) on a StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems). Samples were incubated for 10 min at 95°C; then, 40 cycles were performed (10 s at 95°C and 30 s at 60°C), and melting-curve analysis was performed between 60°C and 95°C. cDNA samples were amplified with Mx1 primers (5'-AGCCACTGGACTGACG ACTTG-3' [forward] and 5'-AAATCACCACGGCTAACGGATAAG-3' [reverse]). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) primers (5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' [forward] and 5'-GCCCAATA CGACCAATCC-3' [reverse]) were used for normalization (48).

**Cell-to-cell infection.** Jurkat cells (10<sup>6</sup>) or PBLs (5 × 10<sup>5</sup>) were transfected with 5 µg of HTLV-1– or HTLV-2–LTR–luciferase plasmids using the Neon Transfection System (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The cells were then treated with various amounts (0 to 5,000 U/ml) of IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio) for 24 h prior to coculture with HTLV-1-infected (C91-PL) or HTLV-2-infected (C19) cells (3:1 ratio). Prior to coculture, C91-PL or C19 cells were irradiated (77 Gy) from a <sup>137</sup>Cs source (CIS BIO international; IBL 637) at 1.28 Gy/min. After 24 h of coculture, reporter activities were assayed using the luciferase reporter assay system (Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

(i) AZT treatment. Jurkat cells or PBLs were treated with 50  $\mu$ M AZT (Sigma) 24 h and 3 h before coculture with HTLV-infected and irradiated cells.

(ii) Serum treatment. Jurkat cells were incubated 3 h before coculture in the presence of sera (1:1,000) obtained either from an HTLV-negative blood donor or from a HAM/TSP patient.

**Cell-free infection.** 293T cells  $(6 \times 10^6)$  were seeded onto 100-mm dishes. Twenty-four hours later, the cells were transfected with 2 µg of the pCMVHT1-M packaging plasmid and 6 µg of the pCRU5-HT1GFPLuc reporter plasmid using the Polyfect reagent (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Forty-eight hours posttransfection, supernatants were collected and filtered through a 0.45-µm filter. Five hundred microliters of filtered supernatant in the presence of Polybrene (8 µg/ml) was added to 10<sup>6</sup> Jurkat cells that had been treated or not with 1,000 U/ml of IFN- $\alpha$ 2a for 24 h. Luciferase activity was measured 48 h postinfection (luciferase assay system; Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

Transfections with Tax-encoding plasmids. 293T cells  $(3 \times 10^5)$  were seeded onto 6-well plates. The following day, 2 μg of a plasmid encoding Tax1 or Tax2 and 250 ng of a plasmid carrying the firefly luciferase gene under the control of the viral HTLV LTR (HTLV-1–LTR–luc or HTLV-2–luc) were transfected (PolyFect; Qiagen). The transfections were carried out in the presence of a *Renilla* luciferase vector (phRG-TK; 10 ng) in order to normalize for the transfection efficiency. The cells were then treated with increasing amounts (0 to 1,000 U/ml) of IFN-α. Luciferase activity was assayed 24 h posttransfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Jurkat-LTR-luciferase cells ( $10^6$ ) were transfected with 5 µg of a plasmid encoding Tax1 or Tax2 using the Neon Transfection System (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Cells were treated or not with 500 U/ml IFN- $\alpha$ 2a. Twenty-four hours later, reporter activities were assayed using the luciferase reporter assay system (Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

**Transfections with HTLV molecular clones.** Jurkat cells (10<sup>6</sup>) or PBLs (5 10<sup>5</sup>) were transfected with 2.5  $\mu$ g of pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2), or SV2Neo (control) and 2.5  $\mu$ g of the HTLV-1– or HTLV-2– LTR–luciferase plasmid using the Neon Transfection System (Invitrogen). Cells were treated or not with 1,000 U/ml of IFN- $\alpha$ 2a. Forty-eight hours later, reporter activities were assayed using the luciferase reporter assay system (Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

293T cells (3  $\times$  10<sup>6</sup>) were seeded onto 100-mm dishes. The following

day, 8 µg of pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2), or SV2Neo (backbone) plasmids was transfected with PolyFect reagent (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The cells were immediately incubated in the presence of IFN- $\alpha$ 2a (0 to 1,000 U/ml) for 48 h.

**Fluorescence microscopy.** 293T-LTR-GFP cells were seeded at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells per well onto 6-well plates. The following day, 2 µg of pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2), or SV2Neo backbone plasmids was transfected with PolyFect reagent (Qiagen). Two days after transfection, transfected 293T-LTR-GFP cells treated with 0 to 1,000 U/ml of IFN- $\alpha$  were analyzed with an AMG Evos fl Digital Inverted Fluorescence Microscope to visualize GFP fluorescence.

**PKR inhibition. (i) C16 treatment.** Jurkat cells were transfected with pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2), or SV2Neo (backbone) and with the HTLV-1– or HTLV-2–LTR–luciferase plasmid as described above. One hour posttransfection, the cells were incubated in the presence of 50 nM imidazolo-oxindole C16 compound (PKR inhibitor; Sigma) resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) or in the presence of DMSO alone (control). Two hours later, cells were treated or not with 1,000 U/ml of IFN- $\alpha$ 2a. Forty-eight hours later, reporter activities were assayed using the luciferase reporter assay system (Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

(ii) PKR siRNA transfection. 293T cells were seeded at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells per well onto 6-well plates. The following day, 20 nM PKR small interfering RNA (siRNA) (On-Targetplus Smart pool EIF2AK2; Fermentas) or control siRNA (On-Targetplus Nontargeting Pool; Fermentas) were transfected (HiPerfect reagent; Qiagen) following the manufacturer's instructions. Twelve hours posttransfection, 1.2  $\mu$ g of pACH or PH6neo plasmid or a plasmid encoding GFP, together with 20 nM siRNA, was transfected (Attracten; Qiagen) following the manufacturer's instructions. Cells were then treated or not with 100 U/ml of IFN- $\alpha$ 2a for 48 h.

Immunoblot analyses. Cells were washed with PBS, lysed (50 nM Tris-HCl, pH 7.4, 150 nM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P-40, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) in the presence of protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science) and incubated on ice. Cell debris was pelleted by centrifugation, and the protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad). Sixty micrograms of the proteins was loaded onto 4 to 12% NuPAGE gels (Novex; Invitrogen), subjected to electrophoresis at 150 V, and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P; Millipore). The membranes were blocked in a 5% milk-PBS-0.05% Tween 20 solution and then incubated overnight with the primary antibody, anti-PKR 71/10; dilution, 1:500) (49), anti-phospho-PKR (Epitomics 1120-1; dilution, 1:2000), anti-Tax-1-specific (Tab 172; dilution, 1:4,000), anti-Tax-2 (GP3738; dilution, 1:4,000) (50), anti-HTLV-1/2 p24 (Zeptometrix 75/4.21.11; 2.5 µg/ml; dilution. 1:400), or anti-β-actin clone AC74 (Sigma; dilution, 1:40,000). The next day, the membranes were washed and incubated either with anti-rabbit or with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and developed using an ECL Plus reagent kit (GE Healthcare).

### RESULTS

IFN- $\alpha$  prevents HTLV infection and/or expression only in *de novo*-exposed T cells. Chronically infected and transformed HTLV T-cell lines have previously been reported to be insensitive to IFN- $\alpha$  antiviral properties (31–33). However, IFN- $\alpha$  effects on *de novo* T-cell HTLV infection have not been investigated. We therefore used a coculture setting that allowed us to investigate HTLV-1/2 *de novo* infection in T cells in the presence or absence of type I interferon. First, we assessed Mx1 gene (a known interferon-inducible gene) expression in Jurkat cells following IFN-I treatment. A 700-fold increase in *Mx1* mRNA was observed upon IFN-I addition (Fig. 1), demonstrating that IFN- $\alpha$  signaling is intact and promotes ISG expression in those cells. Jurkat target cells were then treated with IFN- $\alpha$  and then cocultured with gamma-irradiated C91-PL or C19 cells, used here as donor cells. In order to monitor *de novo* infection, target cells were transfected with an HTLV-1– or HTLV-2–LTR–luc reporter plasmid prior to coculture. In this system, LTR-dependent luciferase activity in target cells parallels viral expression driven from the LTR. Since Tax protein is necessary for LTR activation, levels of LTR-dependent luciferase activity indicate that viral entry, reverse transcription, proviral integration, *de novo* viral transcription, and post-transcriptional production of viral proteins have been completed, allowing at least the production of Tax (Fig. 1B).

Target cells cocultured either with C91-PL (Fig. 1C) or with C19 (Fig. 1D) donor cells showed a dose-dependent decrease in luciferase activity when treated with increasing amounts of IFN- $\alpha$ , indicating an IFN- $\alpha$ -induced decrease in viral expression. In order to determine whether donor cells could secrete Tax that would then activate the LTR-driven transcription in target cells independently of *de novo* infection, a similar experiment was performed with C8166 cells that synthesize Tax in larger amounts than C91-PL cells (data not shown) but do not produce any viral particles (51). In this case, luciferase activity was similar to background levels in the absence or presence of IFN- $\alpha$  (Fig. 1C and D, lanes 2 and 3). Similarly, background levels of luciferase activity with non-infected Jurkat cells (Fig. 1C and D, lane 1).

To rule out the possibility that the luciferase signal is linked to passive diffusion of the Tax protein following membrane fusion, Jurkat target cells were also incubated with serum obtained from a healthy donor or from an HTLV-1 HAM/TSP patient (Fig. 1E) or with AZT, an inhibitor of reverse transcriptase (52) (Fig. 1F and G). AZT or HAM/TSP serum treatment led to a significant decrease in luciferase activity, whereas serum from healthy blood donors did not (Fig. 1E, F, and G). A similar experiment was also performed using PBLs obtained from healthy blood donors as target cells (Fig. 1H and I). The PBLs were transfected with an HTLV-luc reporter plasmid and treated with IFN-α or with AZT prior to coculture with HTLV-1 or HTLV-2 chronically infected cells. Both AZT and IFN- $\alpha$  induced a decrease in the luciferase activity (Fig. 1F and I). Altogether, these results demonstrate that luciferase signal is linked to de novo Tax synthesis and not to Tax transfer from HTLV-1/2-infected cells into target cells.

Finally, to rule out an indirect effect of IFN- $\alpha$  on C91-PL or C19 donor cells during coculture, IFN- $\alpha$ -pretreated target cells were washed before coculture with HTLV donor cells. The same dose-dependent decrease in luciferase activity was observed, confirming that IFN- $\alpha$  acts on target cells and not on donor cells (data not shown).

Altogether, these results demonstrate that productive infection of target cells is necessary for LTR activation and show that IFN- $\alpha$ pretreatment results in decreased viral expression in T cells exposed *de novo* to HTLVs.

IFN- $\alpha$  does not affect the first steps of the HTLV viral cycle. We next aimed to determine which steps of the viral cycle are targeted by IFN- $\alpha$ . To investigate the first steps of the HTLV viral cycle, i.e., viral entry and reverse transcription, we used a modified HTLV-1 genome in which a reporter cassette allowing expression of the *luciferase* gene was inserted downstream of a cytomegalovirus (CMV) promoter. This construct allows possible effects of IFN- $\alpha$  on integration, LTR-driven transcription, and/or posttran-



FIG 1 IFN-α treatment prevents HTLV-1 and HTLV-2 replication in T cells. (A) Jurkat cells were treated with 1,000 U/ml of IFN-α for 24 h, and Mx1 expression was determined by qRT-PCR. The values were normalized to GAPDH expression and compared to Mx1 expression in untreated cells, which was set to 1. The data are presented as the means and standard deviations (SD) from 3 independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student *t* test; \*\*, P < 0.01). (B) Jurkat cells or PBLs were transfected with 5 µg of a plasmid carrying the luciferase gene under the control of the HTLV-1–LTR or HTLV-2–LTR and treated with IFN-α (0 to 5,000 U/ml) for 24 h. (C to I) Cells were then cocultured with irradiated HTLV-1 (C91-PL) (C, E, F, and H) or HTLV-2 (C19) (D, G, and I) or noninfected Jurkat or C8166 (Tax-expressing) T cells for 24 h. Tax expression was indirectly analyzed by a luciferase assay. Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as the fold change compared to untreated cells arbitrarily set to 100%. (E) Three hours before coculture with irradiated C91-PL cells, Jurkat cells were incubated in the presence of serum (1:1,000) obtained either from a healthy blood donor or from a HAM/TSP patient. (F to I) Jurkat cells (F and G) or PBLs (H and I) were treated with AZT (50 µM) before coculture with C91-PL or C19 irradiated cells. (E to G) The data are means and SD from 3 independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences between treated cells (paired Student *t* test; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; NS, nonsignificant.) (H and I) The data are representative of two different experiments obtained with two different blood donors.



FIG 2 IFN-α treatment does not inhibit the early steps of the HTLV-1 viral cycle. Pseudotyped viral particles were produced after transfection of  $6 \times 10^6$  293T cells with 2 µg of the pCMVHT1-M packaging plasmid and with 6 µg of a single-cycle reporter construct pCRU5-HT1GFPluc plasmid. Jurkat cells (10<sup>6</sup>) were treated (1,000 U/ml IFN-α) or not for 24 h before infection with viral particles. Infection was assessed 48 h later with a luciferase assay. Luciferase activity values were normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as the fold change compared to untreated cells arbitrarily set to 100%. The data are presented as the mean and SD from 3 independent experiments. NS, no statistically significant difference between treated and untreated cells (paired Student *t* test).

scriptional viral protein synthesis to be overcome. Viral particles pseudotyped with the HTLV-1 envelope were produced in 293T cells. Jurkat target cells were then pretreated with IFN- $\alpha$ or left untreated for 24 h before incubation with pseudotyped viruses. Expression of the transduced *luciferase* gene was then assessed. IFN- $\alpha$  treatment did not significantly alter luciferase activity in target cells (Fig. 2), indicating that neither entry nor reverse transcription is affected. Altogether, these results suggest that IFN- $\alpha$  inhibits a post-reverse transcription step of the HTLV viral cycle.

IFN-α treatment transcriptionally and/or posttranscriptionally inhibits HTLV expression. Since early steps of the HTLV cycle are not sensitive to IFN- $\alpha$ , we took advantage of the available HTLV-1 and HTLV-2 molecular clones. These plasmids allow the study of the viral steps that follow entry and reverse transcription. Target cells were transfected with the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6Neo) molecular clone and treated with increasing amounts of IFN- $\alpha$  (Fig. 3). Transfections were first performed in 293T target cells stably harboring an LTR-controlled GFP reporter gene whose expression parallels viral LTR-driven transcription. As additional and independent read-outs for viral expression, we also monitored formation of syncytia, indicative of Env expression, and intracellular  $p24_{gag}$  expression. IFN- $\alpha$  treatment decreased the number of GFP-positive cells (Fig. 3A), indicating that IFN-α inhibited HTLV-1/2 LTR-driven transcription, either directly by altering Tax-mediated viral transcription or indirectly by decreasing Tax levels at posttranscriptional steps. IFN-a treatment also decreased the number of syncytia (Fig. 3A) and induced a dose-dependent decrease in intracellular p24<sub>gag</sub> protein levels (Fig. 3B and C), indicating that expression of both HTLV-1 and HTLV-2 Env and Gag proteins was altered. Consistent with those results, p19 levels in the supernatant also decreased (data not shown).

To confirm these results in T cell lines, Jurkat cells (Fig. 3D and E) or primary PBLs (Fig. 3F and G) were transfected with the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6Neo) molecular clone, together with the HTLV-1–LTR–luc (Fig. 3D and F) or HTLV-2– LTR–luc (Fig. 3E and G) reporter plasmid. Cells were then treated or not with IFN- $\alpha$  before luciferase assays were performed. As in 293T cells, a significant decrease in luciferase activity was observed in the presence of IFN- $\alpha$ .

Altogether, these results indicate that IFN- $\alpha$  treatment leads to decreased viral expression at a transcriptional or posttranscriptional stage.

IFN- $\alpha$  does not alter Tax-mediated transcription from the viral LTR. To assess whether IFN- $\alpha$  directly affects HTLV transcription, 293T cells were transfected with an HTLV-1- or HTLV-2-LTR-luc reporter construct, together with a CMV-dependent Tax expression plasmid, in the presence of increasing doses of IFN- $\alpha$  (Fig. 4A). Similar experiments were performed using Jurkat cells stably transfected with an HTLV-1 LTR construct (Fig. 4D), which can be activated either by HTLV-1 or by HTLV-2 Tax proteins (50). The CMV-dependent Tax expression plasmid ensures high levels of Tax. Hence, in these experimental settings, IFN-α should not affect Tax production. Interestingly, IFN-α treatment had no effect on Tax1-mediated (Fig. 4B and E) or Tax2-mediated (Fig. 4C and F) transcription, demonstrating that it did not prevent recruitment of the RNA Pol II machinery onto the LTR by Tax and suggesting that it affects posttranscriptional stages of viral expression.

IFN-α treatment inhibits posttranscriptional viral expression through PKR activation. The PKR gene is an ISG that has been shown to inhibit viral mRNA translation from other viruses. We therefore sought to determine whether the inhibitory effects of IFN- $\alpha$  on HTLV-1/2 expression were linked to PKR activation. 293T cells were transfected with the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6Neo) molecular clone and treated with increasing amounts of IFN- $\alpha$  (Fig. 5). As seen in Fig. 3, Western blot analyses on cell lysates showed a decrease in intracellular  $p24_{\rm gag}$  and Tax levels upon IFN-α treatment (Fig. 5A and B). Interestingly, IFN-α treatment also led to a dose-dependent increase in both total PKR and activated PKR (phospho-PKR [P-PKR]) levels in HTLV-transfected cells, as well as in mock-transfected cells (Fig. 5A and B, compare lanes 1 to 4 to lanes 5 to 8). Thus, the IFN- $\alpha$ -induced decrease in viral expression correlates with the induction and activation of PKR.

To further test whether PKR is involved in inhibition of HTLV expression, PKR was silenced by siRNA before transfection of the HTLV-1 or HTLV-2 molecular clone and IFN- $\alpha$  treatment (Fig. 5C and D). In cells transfected with irrelevant siRNA, IFN- $\alpha$  led to decreased intracellular p24<sub>gag</sub> levels (Fig. 5C and D, lanes 1 to 2), concomitant with increased PKR and P-PKR levels. In contrast, cells transfected with PKR-specific siRNA displayed higher levels of p24<sub>gag</sub> protein in the absence of IFN- $\alpha$  treatment and remained insensitive to IFN- $\alpha$  treatment (Fig. 5C and D, compare lane 3 to lane 1 and lane 4 to lane 2). As a control, a plasmid encoding GFP was transfected. As expected, GFP expression was not affected by IFN- $\alpha$  either in the presence of control siRNA or when PKR-specific siRNA was transfected (Fig. 5E).

Jurkat cells were also transfected with the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6Neo) molecular clone and the HTLV-1– or HTLV-2–LTR–luc reporter plasmid (Fig. 5F and G). The Jurkat cells were then treated or not with IFN- $\alpha$  in the presence of C16, a specific PKR-inhibiting compound (53). A similar experiment was also performed using primary PBLs (Fig. 5H). Consistent with experiments performed with PKR siRNA, C16 compound prevented IFN- $\alpha$  from inhibiting luciferase activity both in Jurkat cells and in primary lymphocytes (Fig. 5F, G, and H).



FIG 3 IFN- $\alpha$  treatment inhibits HTLV-1 and HTLV-2 protein expression. (A) 293T-LTR-GFP cells (3 × 10<sup>5</sup>) were transfected with 2 µg of the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6neo) molecular clone and treated for 48 h with IFN- $\alpha$  (0 to 1,000 U/ml). The cells were then analyzed using an AMG Evos fl Digital Inverted Fluorescence Microscope. Scale bars, 400 µm. (B and C) Western blot analyses (anti-gag p24 or anti-actin) were performed on 60 µg of proteins from whole-cell extracts obtained from cells transfected with the HTLV-1 (pACH) (B) or HTLV-2 (pH6neo) (C) molecular clone and treated with different doses of IFN- $\alpha$ . (D to G) Jurkat cells (10<sup>6</sup>) (D and E) or PBLs (5 × 10<sup>5</sup>) (F and G) were transfected with 2.5 µg of the HTLV-1 (pACH) (D and F) or HTLV-2 (pH6neo) (E and G) molecular clone, together with 2.5 µg of the HTLV-1 or HTLV-2 tTR reporter plasmid, and treated for 48 h with IFN- $\alpha$  (0 to 1,000 U/ml). Luciferase activity values were normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as the fold change compared to untreated cells arbitrarily significant differences between treated and untreated cells (paired Student *t* test; \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

These results demonstrate that PKR is a major effector of IFN- $\alpha$  inhibitory properties and indicate that IFN- $\alpha$  most likely inhibits HTLV expression through PKR-mediated inhibition of viral translation.

### DISCUSSION

Interferon type I response allows cells to be protected against viruses. A recent report demonstrated that different viruses are targeted by specific sets of ISGs (54). The role of IFN-I in HTLV-1 pathogenesis, however, is controversial. The well-described cytostatic and antiviral properties of IFN-I first provided a strong rationale for treating HTLV-1-infected patients. A high PVL is one of the best predictors of HAM/TSP and ATLL, though HTLV persists and PVL is elevated in HAM/TSP patients in spite of an important cellular immune response against HTLV-1 antigens (55). A number of studies convincingly demonstrated that exogenous

larly efficient for treating leukemic, smoldering, and chronic ATLL patients and significantly improves their survival, although the precise mechanism of action is still debated. It might involve an effect both on infected transformed cells that are poorly sensitive to IFN-I but respond to AZT if they have an intact p53 pathway and on noninfected cells present in the microenvironment that should become refractory to infection due to IFN-I (39, 56, 57). In contrast, IFN- $\alpha$  leads only to a minimal decrease in HTLV-1 PVL in HAM/TSP patients (27), suggesting that it cannot allow clearance of HTLV-1-infected cells, but rather, only transiently suppresses viral expression. This effect might be explained by partial or inefficient IFN- $\alpha$  antiviral activity on HAM/TSP patients' infected cells isolated from HAM/TSP patients were compared to those obtained from asymptomatic carriers or healthy controls

IFN- $\alpha$ , alone or in combination with other molecules, is particu-



FIG 4 IFN- $\alpha$  does not prevent Tax-mediated viral transcription. (A to C) 293T cells (3 × 10<sup>5</sup>) were transfected with 250 ng of HTLV-1–LTR–luc or HTLV-2–luc plasmids, 10 ng of a plasmid encoding *Renilla* luciferase, and 2 µg of a plasmid encoding HTLV-1 Tax (Tax1) (B), a plasmid encoding HTLV-2 Tax (Tax2) (C), a backbone vector. The cells were then treated with increasing amounts of IFN- $\alpha$  (0 to 1,000 U/ml), and 24 h after transfection, luciferase activity was measured and normalized. (D to F) Jurkat-LTR-luciferase cells (10<sup>6</sup>) were transfected with 5 µg of Tax1 or Tax2 plasmids and treated for 24 h with 500 U/ml of IFN- $\alpha$ . Luciferase activity was measured and normalized by protein concentration using the Bradford method. Values were calculated as the fold change compared to untreated cells arbitrarily set to 100%. (B, C, E, and F) The data are presented as the means and SD from 2 independent experiments. NS, no significant difference between treated and untreated cells (paired Student *t* test).

suggested that a subset of IFN-inducible genes specifically contributes to HAM/TSP development rather than to the control of infection (58). Therefore, in HAM/TSP patients, some ISGs may promote inflammatory responses rather than immune responses able to control infected cells. Altogether, these results highlight the fact that the quality of IFN- $\alpha$  action varies according to the clinical status of HTLV-1-infected individuals. Deciphering the cellular and molecular bases of IFN- $\alpha$  treatment efficacy in ATLL compared to HAM/TSP is important. A previous report demonstrated that AZT/IFN- $\alpha$  treatment does not have a direct cytotoxic effect *in vitro* on *ex vivo* ATLL cells (32). Using experimental settings that allowed us to study individual steps of the viral cycle in T cells, we report here that IFN- $\alpha$  treatment of uninfected T cells markedly inhibits HTLV-1/2 infection,



FIG 5 The IFN- $\alpha$  inhibitory effect is mediated through PKR activation. (A and B) 293T cells (3 × 10<sup>6</sup>) were transfected with 8 µg of the HTLV-1 (pACH) (A) or HTLV-2 (pH6neo) (B) molecular clone or with a control plasmid (SV2Neo) and treated with increasing amounts of IFN- $\alpha$  (0 to 1,000 U/ml) for 48 h. Western blot analyses using anti-gag p24, anti-Tax1, anti-Tax2, anti-PKR, anti-P-PKR, and anti-actin were performed on 60 µg of proteins from whole-cell extracts obtained from transfected cells. (C, D, and E) 293T cells (3 × 10<sup>5</sup>) were transfected with 20 nM siRNA directed against PKR (siPKR) or with 20 nM control siRNA. Twelve hours later, the cells were transfected with 20 nM the same siRNA, together with 1.2 µg of HTLV-1 (pACH) (C), HTLV-2 (pH6neo) (D), or a plasmid encoding GFP (E) and incubated or not with 100 U/ml of IFN- $\alpha$ . (F to H) Jurkat cells (10<sup>6</sup>) (F and G) or primary lymphocytes (10<sup>5</sup>) (H) were transfected with 2.5 µg of the HTLV-1 or HTLV-2 LTR reporter plasmid, and treated for 48 h with IFN- $\alpha$  (0 to 1,000 U/ml) in the presence of a PKR inhibitor (C16; 100 nM). Luciferase activity values were normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as the fold change compared to untreated cells set to 100%. The data are presented as the means and SD from 2 or 3 independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student *t* test; \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01).

as was also previously shown for HIV-1 (59). However, unlike HIV-1, this effect is not linked to a preintegration defect. In fact, we demonstrate that IFN- $\alpha$  affects both HTLV-1/2 protein expression and viral production. Consistent with a previous observation (34), we also observed a strong decrease in p19<sub>gag</sub> production in culture supernatant following IFN- $\alpha$  treatment (data not

shown). Kinpara et al. also reported that IFN- $\beta$  secretion by murine cells resulted in decreased p19<sub>gag</sub> in culture supernatant from IL-2-dependent (immortalized) HTLV-1-infected cells derived from different ATLL patients (30). Ilinskaya et al. recently demonstrated that the tetherin gene, a known ISG, strongly reduces cell-free infectivity of HTLV-1, but not cell-cell transmission (35).

The fact that most transmission in our experimental system occurred through cell-cell contact (data not shown), therefore, excludes the possibility that tetherin plays a significant role in the IFN- $\alpha$  effects observed here and suggests that the decrease in viral production in the culture supernatant should have little effect on viral spread.

We demonstrated that IFN- $\alpha$  treatment promotes PKR phosphorylation. PKR is a kinase that is expressed in all tissues at a basal level and is induced by IFN-I (13). Active PKR is known to affect phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2), which then suppresses mRNA translation (13). It would therefore be interesting to define whether HTLV-1/2 protein synthesis is affected through eIF2 phosphorylation, unlike a number of other viruses that evade this phenomenon (60, 61, 62).

Altogether, our experiments demonstrate that HTLV-1 and HTLV-2 are exquisitely sensitive to IFN- $\alpha$ . How can these data be reconciled with other studies demonstrating that HTLV-1-transformed or HTLV-1 Tax-expressing cells are insensitive to IFN-α and that Tax-1 blunts IFN signaling (63-67)? We hypothesize that Tax expression renders HTLV-infected cells poorly sensitive to IFN- $\alpha$ . Because incoming viral particles do not contain Tax, they do not alter IFN- $\alpha$  signaling in *de novo*-infected cells. Therefore, addition of the cytokine to target cells prior to infection activates transcription of ISGs (such as the PKR gene), which then impair completion of the HTLV cycle. If this model is correct, immediately treating ex vivo HTLV-1 patient cells (which do not originally express Tax) (68) with IFN- $\alpha$  should prevent viral expression, while the cells should become insensitive to the treatment a few hours after they are put into culture. Consistent with this hypothesis, Kinpara et al. reported that treating PBMCs obtained from a chronic ATLL patient with recombinant IFN-I strongly suppressed HTLV-1 p19 in the cell culture supernatant (30). AZT was previously shown to inhibit telomerase activity in HTLV-1-infected cells and to induce senescence (56). Since Tax expression is required for cell growth, this might also partly explain why treating infected cells that do not express or barely express Tax (the ATLL situation) with IFN-α/AZT allows their clearance.

In conclusion, the results presented here show that IFN- $\alpha$  inhibits HTLV infection in T lymphocytes exposed *de novo* to HTLV-1 or HTLV-2. Hence, IFN- $\alpha$  likely contributes to limiting viral spread to uninfected cells in asymptomatic carriers.

### ACKNOWLEDGMENTS

R.M., C.J., and A.C. are supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. S.A.C. is supported by InCa. N.L.K. was supported by the Croucher Foundation. We acknowledge the support of ARC and InCa (Cancéropôle CLARA) and of La Ligue Contre le Cancer (Équipe Labelisée).

We thank P. Green and D. Derse for the gifts of different plasmids. We thank E. Meurs for the gift of the PKR antibody and M. I. Thoulouze for the gift of the Jurkat-LTR-luc cell line. We thank A. Gessain for the gift of TSP/HAM serum. We thank A. Cimarelli, T. Ohlmann, and the members of the Mahieux laboratory for their helpful suggestions. The figures were produced by Servier Medical Art.

### REFERENCES

- 1. Gessain A, Cassar O. 2012. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Front. Microbiol. 3:388.
- Anonymous. 1988. The third nation-wide study on adult T-cell leukemia/ lymphoma (ATL) in Japan: characteristic patterns of HLA antigen and HTLV-I infection in ATL patients and their relatives. The T- and B-cell Malignancy Study Group. Int. J. Cancer 41:505–512.

- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet ii:407–410.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet i:1031–1032.
- 5. Takatsuki T. 1977. Adult T-cell leukemia in Japan, p 73–77. *In* Seno S, Irino S (ed), Topics in hematology. Excerpta Medica, Amsterdam, The Netherlands.
- Murphy EL, Fridey J, Smith JW, Engstrom J, Sacher RA, Miller K, Gibble J, Stevens J, Thomson R, Hansma D, Kaplan J, Khabbaz R, Nemo G. 1997. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. Neurology 48: 315–320.
- Bartman MT, Kaidarova Z, Hirschkorn D, Sacher RA, Fridey J, Garratty G, Gibble J, Smith JW, Newman B, Yeo AE, Murphy EL. 2008. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human Tlymphotropic virus type II infection. Blood 112:3995–4002.
- Feuer G, Green PL. 2005. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. Oncogene 24:5996– 6004.
- 9. Kannian P, Green PL. 2010. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): molecular biology and oncogenesis. Viruses 2:2037–2077.
- Rende F, Cavallari I, Romanelli MG, Diani E, Bertazzoni U Ciminale V. 2012. Comparison of the genetic organization, expression strategies and oncogenic potential of HTLV-1 and HTLV-2. Leuk/ Res. Treatment 2012: 876153.
- Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus interference. I. The interferon. Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 147:258–267.
- de Weerd NA, Nguyen T. 2012. The interferons and their receptors distribution and regulation. Immunol. Cell Biol. 90:483–491.
- Sadler AJ, Williams BR. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. Nat. Rev. Immunol. 8:559–568.
- Wang BX, Fish EN. 2012. The yin and yang of viruses and interferons. Trends Immunol. 33:190–197.
- Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, Hermine O, Lepelletier Y, Herbeuval JP. 2010. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. Blood 115:2177–2185.
- Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, Uchiyama T. 2004. Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. Br. J. Haematol. 125:568–575.
- Gill PS, Harrington W, Jr, Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA, Bernstein-Singer M, Espina BM, Cabral L, Allen S, Kornblau S, Pike MC, Levine AM. 1995. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. N. Engl. J. Med. 332:1744–1748.
- Hermine O, Allard I, Levy V, Arnulf B, Gessain A, Bazarbachi A. 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. 3:276–282.
- Hermine O, Bouscary D, Gessain A, Turlure P, Leblond V, Franck N, Buzyn-Veil A, Rio B, Macintyre E, Dreyfus F, Bazarbachi A. 1995. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. N. Engl. J. Med. 332:1749–1751.
- Matutes E, Taylor GP, Cavenagh J, Pagliuca A, Bareford D, Domingo A, Hamblin M, Kelsey S, Mir N, Reilly JT. 2001. Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. Br. J. Haematol. 113:779–784.
- Ratner L, Harrington W, Feng X, Grant C, Jacobson S, Noy A, Sparano J, Lee J, Ambinder R, Campbell N, Lairmore M. 2009. Human T cell leukemia virus reactivation with progression of adult T-cell leukemia-lymphoma. PLoS One 4:e4420. doi:10.1371/journal.pone.0004420.
- 22. White JD, Wharfe G, Stewart DM, Maher VE, Eicher D, Herring B, Derby M, Jackson-Booth PG, Marshall M, Lucy D, Jain A, Cranston B, Hanchard B, Lee CC, Top LE, Fleisher TA, Nelson DL, Waldmann TA. 2001. The combination of zidovudine and interferon alpha-2B in the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. Leuk. Lymphoma 40:287–294.
- 23. Arimura K, Nakagawa M, Izumo S, Usuku K, Itoyama Y, Kira J, Osame M. 2007. Safety and efficacy of interferon-alpha in 167 patients with hu-

man T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. J. Neurovirol. 13:364–372.

- 24. Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, Kuroda Y, Araki S, Mori M, Nagataki S, Matsukura S, Akamine T, Nakagawa M, Yamamoto I, Osame M. 1996. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. Neurology 46:1016–1021.
- Kuroda Y, Kurohara K, Fujiyama F, Takashima H, Endo C, Matsui M, Neshige R, Kakigi R. 1992. Systemic interferon-alpha in the treatment of HTLV-I-associated myelopathy. Acta Neurol. Scand. 86:82–86.
- Nakagawa M, Nakahara K, Maruyama Y, Kawabata M, Higuchi I, Kubota H, Izumo S, Arimura K, Osame M. 1996. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J. Neurovirol. 2:345–355.
- 27. Saito M, Nakagawa M, Kaseda S, Matsuzaki T, Jonosono M, Eiraku N, Kubota R, Takenouchi N, Nagai M, Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M. 2004. Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J. Infect. Dis. 189:29–40.
- 28. Yamasaki K, Kira J, Koyanagi Y, Kawano Y, Miyano-Kurosaki N, Nakamura M, Baba E, Suzuki J, Yamamoto A, Yamamoto N, Kobayashi T. 1997. Long-term, high dose interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. J. Neurol. Sci. 147:135–144.
- 29. Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, Tortevoye P, Otrock Z, Taylor G, Gessain A, Harrington W, Panelatti G, Hermine O. 2010. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. J. Clin. Oncol. 28:4177–4183.
- Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, Furukawa H, Masuda T, Kannagi M. 2009. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. J. Virol. 83:5101–5108.
- 31. Bazarbachi A, El-Sabban ME, Nasr R, Quignon F, Awaraji C, Kersual J, Dianoux L, Zermati Y, Haidar JH, Hermine O, de The H. 1999. Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. Blood 93:278–283.
- 32. Bazarbachi A, Nasr R, El-Sabban ME, Mahe A, Mahieux R, Gessain A, Darwiche N, Dbaibo G, Kersual J, Zermati Y, Dianoux L, Chelbi-Alix MK, de The H, Hermine O. 2000. Evidence against a direct cytotoxic effect of alpha interferon and zidovudine in HTLV-I associated adult T cell leukemia/lymphoma. Leukemia 14:716–721.
- 33. Mahieux R, Pise-Masison C, Gessain A, Brady JN, Olivier R, Perret E, Misteli T, 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.
- Feng X, Heyden NV, Ratner L. 2003. Alpha interferon inhibits human T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts. J. Virol. 77:13389–13395.
- 35. Ilinskaya A, Derse D, Hill S, Princler G, Heidecker G. 2013. Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. Virology **436**:201–209.
- Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y, McNatt M, Hatziioannou T, Bieniasz PD. 2009. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. J. Virol. 83:1837–1844.
- Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Benit L, Ruscetti FW, Hermine O, Pique C. 2011. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. Viruses 3:794-810.
- Pique C, Jones KS. 2012. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. Front. Microbiol. 3:378.
- Journo C, Mahieux R. 2011. HTLV-1 and innate immunity. Viruses 3:1374–1394.
- 40. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. 2012. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. Front. Microbiol. **3:3**23.
- Delebecque F, Pramberger K, Prevost MC, Brahic M, Tangy F. 2002. A chimeric human T-cell lymphotropic virus type 1 with the envelope gly-

coprotein of Moloney murine leukemia virus is infectious for murine cells. J. Virol. **76:**7883–7889.

- 42. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI. 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. Nat. Med. 16:83–89.
- Kimata JT, Wong FH, Wang JJ, Ratner L. 1994. Construction and characterization of infectious human T-cell leukemia virus type 1 molecular clones. Virology 204:656–664.
- Chen IS, McLaughlin J, Gasson JC, Clark SC, Golde DW. 1983. Molecular characterization of genome of a novel human T-cell leukaemia virus. Nature 305:502–505.
- 45. Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS, Miwa M, Sugimura T. 1985. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:3101–3105.
- 46. Derse D, Hill SA, Lloyd PA, Chung H, Morse BA. 2001. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. J. Virol. 75:8461–8468.
- 47. Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, Turpin J, Vinera J, Cote E, Chevalier SA, Kfoury Y, Bazarbachi A, Pique C, Mahieux R. 2013. Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. J. Virol. 87:1123–1136.
- Mathieu C, Guillaume V, Sabine A, Ong KC, Wong KT, Legras-Lachuer C, Horvat B. 2012. Lethal Nipah virus infection induces rapid overexpression of CXCL10. PLoS One 7:e32157. doi:10.1371/journal.pone.0032157.
- Laurent AG, Krust B, Galabru J, Svab J, Hovanessian AG. 1985. Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for the detection of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:4341–4345.
- Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, 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.
- Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D. 1993. HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. Virology 196:15–24.
- Macchi B, Faraoni I, Zhang J, Grelli S, Favalli C, Mastino A, Bonmassar E. 1997. AZT inhibits the transmission of human T cell leukaemia/ lymphoma virus type I to adult peripheral blood mononuclear cells in vitro. J. Gen. Virol. 78:1007–1016.
- Nekhai S, Bottaro DP, Woldehawariat G, Spellerberg A, Petryshyn R. 2000. A cell-permeable peptide inhibits activation of PKR and enhances cell proliferation. Peptides 21:1449–1456.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. 2011. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. Nature 472:481–485.
- Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B. 2013. HTLV-1: persistence and pathogenesis. Virology 435:131–140.
- Datta A, Bellon M, Sinha-Datta U, Bazarbachi A, Lepelletier Y, Canioni D, Waldmann TA, Hermine O, Nicot C. 2006. Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence. Blood 108:1021–1029.
- 57. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. 2013. Interferon-alpha (IFNalpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFNalpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. Retrovirology **10**:52.
- Tattermusch S, Skinner JA, Chaussabel D, Banchereau J, Berry MP, McNab FW, O'Garra A, Taylor GP, Bangham CR. 2012. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. PLoS Pathog. 8:e1002480. doi:10.1371/journal .ppat.1002480.
- Goujon C, Malim MH. 2010. Characterization of the alpha interferoninduced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. J. Virol. 84:9254–9266.
- Garaigorta U, Chisari FV. 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. Cell Host Microbe 6:513–522.

- Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. 2010. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. PLoS One 5:e10575. doi:10.1371/journal.pone.0010575.
- Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2010. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. J. Virol. 84:10457–10466.
- Charoenthongtrakul S, Zhou Q, Shembade N, Harhaj NS, Harhaj EW. 2011. HTLV-I Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-{kappa}Bdependent induction of SOCS1. J. Virol. 85:6955–6962.
- Feng X, Ratner L. 2008. Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon alpha. Virology 374:210–216.
- 65. Oliere S, Hernandez E, Lezin A, Arguello M, Douville R, Nguyen TL, Olindo S, Panelatti G, Kazanji M, Wilkinson P, Sekaly RP, Cesaire R, Hiscott J. 2010. HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by

inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). PLoS Pathog. 6:e1001177. doi:10.1371/journal.ppat.1001177.

- Smith D, Buckle GJ, Hafler DA, Frank DA, Hollsberg P. 1999. HTLV-I-infected T cells evade the antiproliferative action of IFN-beta. Virology 257:314–321.
- Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. 2008. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. Virology 379:306–313.
- Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR. 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.

## II. Article 2 : ADAR1 stimule la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 indépendamment de son activité d'éditing mais via l'inhibition de PKR

**ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication independently of its editing activity but through inhibition of PKR activity,** Cachat A, Alais S\*, Chevalier SA\*, Boniface A, Ko NL, Suspène R, Vartanian JP, Mahieux R Soumis pour publication

### 1. Contexte de l'étude et principaux résultats

L'éditing est une modification post-transcriptionnelle des molécules d'ARN qui comprend notamment la modification des bases azotées. ADAR1 (Adenosine deaminase acting on RNA type I) est une enzyme qui éditent les ARN à caractère double brin (pour revue : Samuel, 2011). Plus précisément, ADAR1 catalyse la désamination de l'adénosine en inosine. L'inosine est ensuite convertie en guanosine par les ribosomes et les ARN polymérases ARN dépendantes. De cette manière, ADAR1 modifie la séquence et la structure de ces ARN. ADAR1 existe sous deux isoformes, ADAR1-p110 qui est exprimée constitutivement et ADAR1-p150 dont l'expression est induite par les interférons de type I. La présence de deux promoteurs distincts et l'épissage alternatif du premier exon sont à l'origine de la synthèse des deux isoformes.

Les deux isoformes éditent des ARN cellulaires et viraux. Concernant les ARN cellulaires, ADAR1 édite par exemple les récepteurs au L-glutamate et à la sérotonine-2c dans le système nerveux central. Concernant les ARN viraux, ADAR1 édite par exemple le génome du virus de l'hépatite D : ADAR1 catalyse l'éditing d'un codon stop en un codon tryptophane, autorisant l'expression de la protéine virale HDAg-L nécessaire à la formation des particules virales (pour revue : Samuel, 2011). Dans ces derniers cas, l'éditing catalysé par ADAR1 est site-spécifique. L'éditing peut aussi être non spécifique (pour revue : Samuel, 2011). Par exemple, des séquences de virus isolés à partir de biopsies de cerveaux de patients atteints du virus de la rougeole et avant développé une panencéphalite sclérosante sub-aigue montrent de l'éditing de A vers G. De même, de l'éditing A vers G est observé sur des ARN viraux chez des souris infectées par le virus Influenza. L'expression exogène des deux isoformes de ADAR1 dans des 293T cotransfectées avec du clone moléculaire de HTLV-2 induit l'éditing du génome viral (Ko et al., 2012). Cependant, ce phénomène semble être un événement très rare in vivo puisque aucune séquence éditée n'a pu être retrouvée dans des cellules mononucléaires de sang périphérique obtenues chez des individus infectés par HTLV-2 (Ko et al., 2012)..

Bien que l'expression de ADAR1-p150 soit induite par les interférons de type I, son rôle antiviral est débattu. En effet, ADAR1 stimule la réplication du virus de l'hépatite C, du VIH-1, du virus de la fièvre jaune, du virus de Chikungunya, du virus du Nil occidental ou encore du virus de l'encéphalite équine du Venezuela (Schoggins *et al.*, 2011). Le mécanisme de l'action pro-virale de ADAR1 est discuté. Une étude montre que ADAR1 stimule le réplication du VIH-1 en bloquant l'activation de la protéine PKR par une interaction directe avec cette protéine (Clerzius *et al.*, 2009). Dans cette étude, le rôle proviral de ADAR1 est indépendant de son activité d'éditing. Dans deux autres études, ADAR1, notamment via son activité éditing, stimule l'expression des protéines virales du VIH-1 (Phuphuakrat *et al.*, 2008, Doria *et al.*, 2008).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de ADAR1 dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2. Nous avons montré dans un premier temps que ADAR1-p150 est surexprimée dans des lymphocytes de sang périphérique d'individus sains suite à leur activation par l'interleukine-2 et la phytohémagglutinine. De plus, ADAR1-p150 est d'avantage exprimée dans des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2 en comparaison à une lignée de lymphocytes T non infectés. Par conséquent, nous avons recherché l'effet de ADAR1 sur l'infection par HTLV-1 et HTLV-2. Nous avons montré que ADAR1 stimule l'infection de novo de lymphocytes par les deux virus. Dans des 293T transfectées par des clones moléculaires de HTLV-1 et HTLV-2, la surexpression de ADAR1 induit une augmentation de l'expression des protéines virales. Nous avons montré que les particules virales produites en présence de ADAR1 étaient toujours infectieuses. Par ailleurs, l'utilisation d'un plasmide codant une protéine ADAR1 déficiente pour son activité catalytique nous a permis de montrer que l'effet pro-viral de ADAR1 sur HTLV-1 et HTLV-2 était indépendant de son activité d'éditing. Nous avons précisé le mécanisme d'action de ADAR1 et avons montré que l'effet pro-viral de ADAR1 sur la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 était médié par l'inhibition des fonctions de PKR. Enfin, nous avons mis en évidence que la surexpression de ADAR1 restaure l'expression des protéines virales dans des 293T transfectées par des clones moléculaires de HTLV-1 et HTLV-2 malgré un traitement à l'IFN-α. Ainsi la surexpression de ADAR1 réprime l'effet inhibiteur de l'IFN-α sur l'infection par HTLV-1 et HTLV-2.

### 2. Article

# ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity

Anne Cachat <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Sandrine Alais<sup>1, 2, 3, 4, 5\*</sup>, Sébastien Chevalier<sup>1, 2, 3, 4, 5\*</sup>, Adrien Boniface<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>, Nga Ling Ko<sup>7</sup>, Rodolphe Suspène<sup>8</sup>, Jean-Pierre Vartanian<sup>8</sup>, Renaud Mahieux <sup>1, 2, 3, 4, 5#</sup>

1: Equipe Oncogenèse Rétrovirale,

2: Equipe labelisée "Ligue Nationale Contre le Cancer"

3: International Center for Research in Infectiology, INSERM U1111 - CNRS UMR5308

4: Ecole Normale Supérieure de Lyon

5: Université Lyon 1, LabEx ECOFECT - Eco-evolutionary dynamics of infectious diseases Lyon, 69364 Cedex 07, France

6: Biology Department, Master Biosciences

7: Unité d'épidémiologie et physiopathoglogie des virus oncogenes, Institut Pasteur,

8: Unité de rétrovirologie moléculaire, Institut Pasteur, Paris, 75015, France

Paris, 75015 France

\*: equal contribution

# Corresponding author: Renaud Mahieux, INSERM U1111 Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Tel: (33)-4-72-72-87-93

Fax: (33)-4-72-72-81-37

Anne.cachat@ens-lyon.fr

### Résultats Article 2

Sandrine.alais@ens-lyon.fr

ChevalierS@visitors.iarc.fr

Adrien.boniface@ens-lyon.fr

theresako@hotmail.com

Rodolphe.suspene@pasteur.fr

jean-pierre.vartanian@pasteur.fr

renaud.mahieux@ens-lyon.fr

### ABSTRACT

**Background**: The role of the innate immunity in general and of IFN-I in particular in HTLV-1 pathogenesis is still a matter of debate. ADAR1-p150 is an Interferon Stimulated Gene (ISG) induced by type I interferon that can edit viral RNAs. We therefore investigated whether it could play the role of an anti-HTLV factor.

**Results**: We demonstrate here that ADAR1 is also expressed in the absence of IFN stimulation in activated primary T-lymphocytes that are the natural target of this virus and in HTLV-1 or HTLV-2 chronically infected T-cells. We show that ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 infection in T-lymphocytes and that this proviral effect is independent from its editing activity. ADAR1 expression suppresses IFN- $\alpha$  inhibitory effect on HTLV-1 and HTLV-2 and acts through the repression of PKR phosphorylation.

**Discussion**: This study demonstrates that two interferon stimulated genes, i.e. PKR and ADAR1 have opposite effects on HTLV replication *in vivo*. The balanced expression of those proteins will determine the fate of the viral cycle in the course of infection.

KEYWORDS: HTLV, interferon, ADAR1, PKR

### BACKGROUND

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) was the first human oncoretrovirus to be discovered [1, 2]. It infects 5 to 10 million people worldwide [3]. Among them, 3 to 5 percent have a lifetime risk to develop a lymphoproliferative disorder named adult T-cell leukemia (ATL) [4], or an inflammatory neurodegenerative disease named HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [5, 6]. HTLV-2 infects 2 to 5 million people. Despite similarities with HTLV-1 in its genomic organization, HTLV-2 is only associated with rare cases of HAM/TSP-like diseases but does not promote leukemia or lymphoma [7, 8]. The cause for such differences is a matter of investigation [9-18]. Nevertheless multiple reports already pointed out the key roles played both by Tax and HTLV-1 antisense-encoded proteins in cell transformation [18-20].

Innate immunity plays a critical role in host response to a viral infection by triggering effector mechanisms that restrict the infection [21]. Effectors of innate immunity such as restriction factors are present in cells before infection takes place and can act as immediate inhibitors of a given infectious agent. Double stranded RNA which is produced during replication of several viruses is a potent inducer of IFN-I which then acts as a signal to induce expression of antiviral effectors, among which ADAR, a cellular protein which edits RNA [22]. RNA editing which does not include capping, 3' processing, and splicing is defined as post-transcriptional events that modify RNA molecules. It is a natural process used by mammal cells to generate different variants of a given protein. Adenosine Deaminase Acting on RNA (ADAR) enzymes are capable of editing double stranded RNA ([23] and for a recent review see [24]). There are three members of the mammalian ADAR family: ADAR1, ADAR2 and ADAR3.

The formers convert adenosines into inosines, which are then translated into guanosines, while ADAR3 which seems restricted mainly to nervous system has no catalytic activity [25, 26].

There are two ADAR1 isoforms. ADAR1-p110 is constitutively expressed and found exclusively in the nucleus, while ADAR1-p150 is an Interferon Stimulated Gene (ISG) induced by type I interferon (IFN-I) [27]. ADAR1-p150 is found in the nucleus and in the cytoplasm [28, 29]. These two isoforms are generated from two distinct promoters and an alternative splicing of the first exon. ADAR1-p110 and ADAR1-p150 have a C terminal catalytic deaminase domain, three dsRNA binding domains and one Z-DNA binding domain in ADAR1-p110 or two in ADAR1-p150. Both ADAR1 isoforms edit cellular and viral RNAs possessing a double-stranded structure [30, 31]. Interestingly, several viruses produce dsRNA during their replication cycle [22].

As ADAR1-p150 expression can be induced by type I interferon, it was anticipated that it would be an effector of type I interferon antiviral effect on viral replication. Indeed, viral genome editing by ADAR1 was described for several viruses [30, 32]. For example, ADAR1 edits hepatitis C viral genome and consequently reduces the level of HCV subgenomic RNA [33]. ADAR1 possesses a repressive activity against lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) [34], and Bovine viral diarrhea virus (BVDV) [35]. Surprisingly however, ADAR1 plays a proviral role for other viruses such as vesicular stomatitis virus [36, 37], Kaposi Sarcoma Virus [38], Epstein-Barr virus [39], Dengue virus [40] and Rift valley virus [31], while controversial results on Hepatitis D, measles and influenza replication have been published [31, 40-49]. ADAR1-p110 and ADAR1-p150 expression increases during the course of infection and promotes HIV-1 viral replication, thus playing a proviral role [50-53]. However, in this case, conflicting mechanisms have also been suggested: one study suggested

that this effect requires ADAR1 editing activity, while another showed that ADAR1 proviral effect is independent from its catalytic site, but relies on the inhibition of the protein kinase R (PKR) function, which normally inhibits mRNA translation and induces apoptosis [50-52]. ADAR1-mediated PKR inhibition was also reported during measles virus or vesicular stomatitis virus infection [36, 37, 49]. Thus, depending on the viruses, ADARs can act either as antiviral or as proviral factors (for recent reviews, see [30, 32]).

IFN-α is being used in combination to AZT to treat ATL patients, although the relationship between stimulation of innate immunity and impact on HTLV cycle are still not fully understood [21, 54, 55]. We recently demonstrated that PKR prevented HTLV-1 and -2 replication in cell culture following IFN-I treatment [11]. In another set of experiments using the exquisitely sensitive 3DI-PCR technique [56], we have also shown that HTLV-2 and Simian T cell leukemia virus type 3 (STLV-3) genomes can be edited by ADAR1 in cells transfected with HTLV-2 or STLV-3 molecular clones and an ADAR1 encoding plasmid [57]. However we could not find such mutations in *ex vivo* samples obtained from HTLV-2 infected individuals, thus demonstrating that ADAR1 editing of HTLV *in vivo* is a very rare phenomenon and is unlikely to play an antiviral role [57]. However, the consequences of ADAR1 expression on HTLV replication were not fully investigated in this report.

Here, we demonstrate first that ADAR1 is expressed in PHA/IL-2 activated primary T lymphocytes in the absence of IFN-I stimulation and in HTLV-1 or HTLV-2 chronically infected T cells. We show that ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 infection in T lymphocytes and that this proviral effect is independent from its editing activity. ADAR1 expression suppresses IFN- $\alpha$  inhibitory effect on HTLV-1 and HTLV-2 through the repression of PKR phosphorylation. Together with our previous results,

these studies demonstrate that two interferon stimulated genes, i.e. PKR and ADAR1 have opposite effects on HTLV replication *in vivo*. The balanced expression of those proteins could determine the fate of the viral cycle in the course of infection.

### RESULTS

### ADAR1 is expressed in activated peripheral blood lymphocytes and in HTLV-1 and HTLV-2 chronically infected T cell lines

ADAR1 was previously shown to edit the genome of some RNA viruses and to act therefore as an antiviral factor [31, 34, 44, 45]. Consequently we first wondered whether ADAR1 was expressed in primary uninfected T-lymphocytes that are the target of HTLV-1 and -2 retroviruses *in vivo* (Figure 1).

Given that HTLV-1 infected T-lymphocytes display an activated phenotype [58], we first obtained Peripheral Blood Lymphocytes (PBLs) from two healthy blood donors and activated them with PHA and IL-2. An aliquot of the same cells was also left quiescent. As expected, ADAR-p110 form was constitutively expressed, while ADAR1-p150 expression was induced following T-cell activation (Figure 1A).

Then, we compared the expression of both ADAR1 isoforms in non-infected Jurkat Tlymphocytes as well as in HTLV-1 (C91-PL and MT2) or HTLV-2 (C19 and MO) infected T-lymphocytes (Figure 1B). While ADAR1-p110 was expressed in all transformed cells including Jurkat, ADAR1-p150 was specifically up-regulated in HTLV-1 and HTLV-2 chronically infected cells.

Altogether, these results show that both isoforms of ADAR1 are expressed in the absence of IFN-I, in activated T-cells that are susceptible to HTLV-1 and HTLV-2 infection. They also demonstrate that HTLV-1 and HTLV-2 chronically infected cells express the inducible ADAR1 isoform.

ADAR1 has a proviral effect on *de novo* HTLV-1 and HTLV-2 infection in Tlymphocytes

We then investigated the effect of ADAR1 expression on *de novo* infection of T-cells with HTLV-1 and HTLV-2 (Figure 2) using a previously described protocol [11].

HTLV-1/-2 infection occurs mainly through cell-cell contact. Jurkat or primary lymphocytes were therefore co-transfected with a plasmid encoding ADAR1 and a plasmid encoding the luciferase indicator gene under the control of the HTLV-1 or HTLV-2 LTR promoters. Twenty-four hours later, those cells were co-cocultured with gamma-irradiated C91-PL (HTLV-1), C19 (HTLV-2) cells or non-infected Jurkat cells. The viral non-structural Tax protein is necessary for activating transcription from the LTR. Consequently, luciferase activity monitors viral infection i.e. viral entry, reverse transcription, integration and viral expression in target cells (Figure 2A).

ADAR1 expression in Jurkat significantly enhanced luciferase activity after co-culture with HTLV-1 or HTLV-2 infected irradiated T-cells (Figure 2B compare lane 3 vs. 4, and Figure 2C lane 3 vs. 4). These results suggest that ADAR1 increases target cells susceptibility to HTLV-1 and HTLV-2 infection. As a control, ADAR1 did not affect the level of luciferase activity in Jurkat target cells cocultured with non-infected T-cells (Figure 2B and 2C lanes 1-2).

Similar experiments were then performed using primary T-lymphocytes obtained from healthy blood donors as target cells, instead of Jurkat cells. As in Jurkat, ADAR1 expression in those cells was associated with an increased luciferase activity (Figures 2D and 2E compare lane 2 vs. 4). To control that luciferase activity was linked to viral infection and not a passive Tax transfer from donor to target cells, we performed a series of control experiments where PBLs were treated or not with AZT, an inhibitor of reverse transcription. As expected, AZT treatment strongly reduced luciferase activity thus demonstrating *de novo* Tax synthesis is required in the target cells (Figure 2D and 2E, lanes 2 vs.3).

Those results demonstrate that ADAR1 has a proviral effect on HTLV-1 and HTLV-2 infection both in T-cell lines and in primary T- lymphocytes.

#### ADAR1 increases HTLV-1 and HTLV-2 protein expression

To decipher how ADAR1 affects HTLV-1/2 replication, Jurkat (Figure 3A-3B) or primary T lymphocytes (Figure 3C-3D) were transfected with molecular clones which contain full length proviruses and HTLV-1 or HTLV-2-LTR-luciferase reporter, in the presence or absence of ADAR1. This system allows us to bypass the entry-integration viral steps cells. In both settings, ADAR1 expression was associated with an increased luciferase activity, thus indicating up-regulation of Tax1 and Tax2 protein expression (Figure 3 A-D compare lane 2 and 3).

293T-LTR-GFP cells were then transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones. Those cells stably harbor a GFP reporter gene whose expression parallels activation of LTR-driven transcription. Consistent with co-culture experiments, ADAR1 expression increased the number of GFP positive cells, thus demonstrating an increased Tax-mediated LTR transcription (Figure 3E compare minus and plus ADAR1). ADAR1 expression was also associated with an increased number of syncitia, indicative of a higher HTLV envelope protein expression (Figure 3E, compare minus and plus ADAR1). Western-blot analyses, performed on 293T cells transfected with a constant amount of HTLV-1 (Figure 3F) or HTLV-2 molecular clone (Figure 3G) and increasing amounts of ADAR1 confirmed those observations. Indeed, both Tax1, Tax2 and p24<sup>gag</sup> protein expression levels increased in a dose dependent manner (Figure 3F-3G). As a control, actin levels remain constant under the same conditions. The amount of p19gag in the culture supernatant, which is assumed to reflect the quantity of viral particles, was also measured in the same experimental conditions. Consistent with western-blot results, p19gag in the supernatant also increased in a dose dependent manner (Figure 3H, 3I).

Thus, these results demonstrate that ADAR1 increases viral expression and viral production in all cell lines tested.

### ADAR1 express does not impair the production of infectious viral particles

Given that ADAR1 possesses an editing activity, we then wondered whether viral particles produced in the presence of ADAR1 were infectious or not. 293T cells were transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones and increasing amount of ADAR1 plasmid. Forty-eight hours after transfection culture medium was removed, cells were extensively washed before being co-cultured with Jurkat-LTR-luciferase cells (Figure 4A). We observed a dose-dependent increase in luciferase activity, suggesting that viral particles that are made in the presence of ADAR1 are still capable of replication in their target cells (Figure 4B, 4C). To control that the luciferase activity measured in the Jurkat target cells was not due to a passive Tax transfer from the transfected cell to the target cell, 293T cells were transfected with Tax1 or Tax2 plasmids and cocultured with Jurkat-LTR-luciferase cells. Luciferase activity was measured and was similar to that of 293T cells transfected with a backbone vector (Figure 4D, 4E).

Altogether, these results demonstrate that ADAR1 has a proviral effect, enhances HTLV-1/-2 expression and release of infectious particles.

### ADAR1 proviral effect is independent from its editing activity

We next wondered whether ADAR1 proviral effect was dependent or not of its editing activity. Using a previously described ADAR1 RNA editing reporter system [40], we first verified that the plasmid encoding ADAR1 with a mutation in its catalytic site was deficient for its editing activity. The unedited reporter plasmid contains a stop codon

that is converted into Trp codon when A to I editing by ADAR1 occurs. As a consequence, editing by ADAR1 is correlated with Firefly luciferase expression. As expected, transfection of wild-type ADAR1 induced an increased luciferase activity (Supplementary Figure 1 left graph), while ADAR1 mutant did not lead to any increase in luciferase expression (Supplementary Figure 1 right graph).

Then, 293T cells were transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones, in the presence of plasmids encoding either wild-type ADAR1 or the editing-deficient ADAR1 mutant. p24<sup>gag</sup> western-blot (Figure 5A, 5B) or p19<sup>gag</sup> ELISA (Figure 5C, 5D) revealed that expression of both wild-type or mutant ADAR1 led to a similar increase in viral protein expression and virus release.

Next, to confirm that editing has no effect on HTLV transcription, we used Jurkat cells transfected with the HTLV-LTR-luciferase reporter plasmids and co transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones, together with wild-type or editing-deficient ADAR1 constructs (Figure 5E, 5F). A similar increase in luciferase activity was observed with wild type or mutant ADAR1. We also determined whether viral particles produced in the presence of both wild-type or mutant ADAR1 plasmids were infectious by performing a coculture assay as described in Figure 2A. ADAR1 mutant expression increased the release of infectious viral particles similarly to ADAR1 wild-type both in HTLV-1 and HTLV-2 settings (Supplementary Figure 2).

Altogether, those results confirm that ADAR1 proviral effect on HTLV-1 and HTLV-2 replication is independent from its editing activity.

### ADAR1 proviral effect is mediated through an inhibition of PKR activation

PKR is an ISG that has been shown to be involved, once activated by phosphorylation, in a signaling pathway leading to inhibition of mRNA translation. It

was previously established that ADAR1 antagonizes PKR activation [37, 49]. We therefore wondered whether ADAR1 proviral effect on HTLV-1 and HTLV-2 could be mediated through PKR inhibition. To test this hypothesis, PKR western-blots were performed on protein extracts obtained from 293T cells transfected with HTLV-1 and HTLV-2 molecular clones together with increasing amount of ADAR1 (Figure 6A, 6B). Consistent with results presented above, the amount of p24<sup>gag</sup> and Tax viral proteins increased in an ADAR1 dose dependent manner, while the level of PKR remained constant (Figure 6A, 6B compare lane 1 vs 2-4). Interestingly, the level of phospho-PKR (i.e. the active form of PKR) was inversely correlated with that of ADAR1 (Figure 6A, 6B, compare lane 1 and 4).

To demonstrate that ADAR1 proviral effect was linked to the inhibition of PKR activation, cells were transfected either with PKR siRNA or with control siRNA before being transfected with HTLV-1/2 molecular clones and ADAR1 plasmid (Figure 6C, 6D). As previously described [11], PKR extinction results in an increased p24 expression. However, despite ADAR1 ectopic expression, the level of p24<sup>gag</sup> remained constant, in cells transfected with PKR siRNA, while it increased when control siRNA were transfected.

Those results demonstrate that ADAR1 effect on HTLV-1 and HTLV-2 is linked to the inhibition of PKR phosphorylation.

### ADAR1 expression reverses IFN- $\alpha$ inhibitory effect on HTLV-1 and HTLV-2

We have recently shown that IFN- $\alpha$  restricts HTLV-1 and HTLV-2 *de novo* infection by inhibiting viral protein synthesis through PKR activation [11]. Since ADAR1 inhibits PKR activation and enhances viral protein translation, we finally wondered whether IFN- $\alpha$  still had an antiviral effect in the presence of ADAR1 ectopic expression.

293T cells were transfected with HTLV-1 (Figure 7A) or HTLV-2 molecular clones (Figure 7B), with or without an ADAR1 expression plasmid, before being treated with increasing amount of IFN- $\alpha$ . In the absence of ADAR and consistent with our previous data [11], IFN- $\alpha$  treatment led to a decreased p24<sup>gag</sup> as well as Tax1 or Tax2 protein expression (Figure 7A and 7B, compare lane 1 and 4). This effect was correlated with an increase in PKR and phospho-PKR levels. In the presence of ADAR1, IFN- $\alpha$  treatment still lead to increased PKR level, but the levels of phospho-PKR remained low and were not associated with a decreased p24<sup>gag</sup> or Tax expression (Figure 7A and 7B, compare lane 5 and 6-8).

These results show that IFN- $\alpha$  cannot activate PKR in the presence of elevated levels of ADAR1, thus ADAR1 expression prevents PKR from having its antiviral role.

### DISCUSSION

ADAR1 is responsible for A-to-G (I) editing of cellular and viral genes [30, 31]. Editing can be site-selective in the case of Hepatitis virus D [41, 42] or of L-glutamate receptor [59]. It can also be non-selective in the case of Hepatitis C, influenza, measles and Rift valley viruses [31, 33, 44]. As ADAR1 expression is induced by IFN-I, it was originally anticipated that IFN-I antiviral effects occur at least partly through an ADAR1 dependent editing of viral genomes. Indeed, *Taylor et al.* demonstrated that IFN- $\alpha$  treatment induces A-to-I editing in HCV replicon cells, while HCV editing is reduced when ADAR1 enzymatic activity is inhibited [33].

We previously demonstrated that co-transfecting ADAR1 together with HTLV-2 or STLV-3 molecular clones in 293T cells led to A-to-G editing although the frequency of such editing could not be quantified [57]. A similar observation was made for measles and influenza viruses [44]. However, such hyper-edited sequences were only detected using the exquisitely sensitive 3DI-PCR technique [31], and replication of those viruses was not tested. In addition, editing was not observed in a series of samples obtained from 20 HTLV-2 infected individuals, although ADAR1 mRNA was present in those samples. This suggested that A-to-G (I) editing is an extremely rare phenomenon *in vivo*, at least in HTLV-2 infected cells [57].

As HTLV-1 mostly infects CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes and HTLV-2 infects CD8<sup>+</sup> Tlymphocytes [16], we measured here ADAR1 p110 and p150 expression in peripheral blood lymphocytes that were left quiescent or PHA/IL-2 activated. Consistent with a previous study [60], both ADAR1 isoforms were present in activated lymphocytes. Thus, ADAR1 is expressed in cells that are target of HTLV-1 and HTLV-2. Consistent with data obtained on HTLV-2 *ex vivo* samples [57], we

have also shown that ADAR1 expression is higher in HTLV-1 and HTLV-2 chronically infected lymphocytes compared to non-infected T cells, thus suggesting that ADAR1 is expressed in response to HTLV infection. Interestingly, *Clerzius et al* have also shown that ADAR1-p110 and ADAR1-p150 expression is increased when Jurkat cells are infected with HIV-1 [50]. It could be of interest to determine in the future which factor induces ADAR1 expression in HTLV-1/-2 infected cells.

ADAR1 proviral effect was previously observed for different viruses [36, 37, 40, 49-52]. This effect is mediated through (1) viral RNA editing, (2) the inhibition of PKR through the formation of an ADAR1/PKR complex or (3) an increase in ADAR1 catalytic activity. We have shown here that ADAR1 effect on HTLV-1/-2 replication is independent from ADAR1 editing activity and is rather linked to the inactivation of PKR function. It could also be of interest to determine whether ADAR1 effect is also linked to the formation of a complex between those two cellular proteins. Of note, our results do not exclude the fact that ADAR1 editing on HTLV-1/2 genomes might also occur, but at a very low frequency thus having no deleterious effect on viral cycle.

Shoggins et al have recently developed an assay to study the effect of hundreds of ISG products on different viruses that belong to *flaviviridae* (YFV, WNV), *togaviridae* (CHIKV, VEEV) or *retroviridae* (HIV-1) [53]. This led to the identification of ISGs that are strong repressors, modest inhibitors, but also activators of viral cycle. In this study, ADAR was identified as an enhancer of replication for all viruses tested. Interestingly, the authors also tested the combination of one inhibitory and one enhancing ISG on viral cycle, and showed that, in most cases, viral replication was more influenced by the inhibitory than by the enhancing ISG [53]. Thus, this study highlighted that IFN-I does not necessarily promote an antiviral state and that a
subtle balance between repressor and activator ISGs regulate the fate of viral infections.

We have previously shown that IFN- $\alpha$  inhibits HTLV-1 and HTLV-2 *de novo* infection through PKR activation [11]. We demonstrated here that another ISG, ADAR1 p150 is expressed in activated T-cells and plays a proviral role on HTLV-1 and HTLV-2 replication. We can therefore elaborate a working hypothesis that, during primary infection and in the absence of IFN-I, HTLV-1/-2 will infect cells that express ADAR1 p150 but not PKR. In this case, ADAR will play a proviral role. Infection could then lead to IFN-I production that could in turn activate both PKR and ADAR-1 p150 in surrounding cells. In this case, according to Schoggins, PKR could play an antiviral role [53]. Given that IFN-I is used to treat chronic ATL patients [61], it would therefore be interesting to measure quantitatively the expression of both PKR and ADAR in ATL cells if those samples were available.

**CONCLUSIONS**: In conclusion, our results demonstrate that IFN-I promotes the expression of two ISG that have antagonist roles on HTLV replication.

### **METHODS:**

#### Cell culture

293T and 293T-LTR-GFP cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life technologies) and 100 µg/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Life technologies). Jurkat, Jurkat-LTR-luc, HTLV-1- (C91/PL, MT2) and HTLV-2-infected T cell lines (C19, MO), were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life technologies) and 100 µg/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Life technologies). Peripheral blood lymphocytes (PBL) were purified from blood samples obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon) and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life technologies) and 100 µg/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Life technologies). PBL were either left quiescent or stimulated with phytohemagglutinin (PHA, SIGMA at 1  $\mu$  g/mL) and interleukin-2 (IL-2 at 150 U/mL) 3 days prior to IFN  $\alpha$ -2a (1000U/mL, Tebu-Bio) treatment for 3 days. 293T-LTR-GFP and Jurkat-LTR-luc are stably transfected with a plasmid encoding GFP (green florescent protein) or luciferase under the control of HTLV-1 long terminal repeat (LTR), respectively [62, 63]. All cell lines were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

#### Plasmids

HTLV-1 proviral DNA clone (pACH) was provided by Dr L. Ratner [64]. HTLV-2 proviral DNA clone (pH6neo) and SV2Neo plasmids were provided by Dr P. Green [65]. pSG5M-Tax1, pSG5M-Tax2, HTLV-1- and HTLV-2-LTR-luciferase plasmids were previously described [15, Halin, 2009 #280]. ADAR1 wild type and editing-

deficient (HAE -> HAG mutation at the position 912) [66] were provided by Dr P. Auewarakul [52]. The 3XF-ADAR1 RNA editing reporter system was provided by Dr. V. Lotteau [40].

#### **Cell-to-cell infection experiments**

Jurkat ( $10^6$ ) or PBL ( $5.10^5$ ) were transfected with 2,5 µg of the HTLV-1 or the HTLV-2-LTR-luciferase plasmids and 2.5 µg of the ADAR1 plasmid (Neon® Transfection System, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Twenty-four hours later, they were co-cultured with irradiated (77 Gy CIS, BIO international, IBL 637) C91/PL or C19 cells (3:1 ratio). When needed, PBLs were treated with 50 µM AZT (Sigma) 24 hours and 3 hours before infection. Twenty-four hours later, reporter activity was assayed (Luciferase reporter assay system, Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

293T ( $3.10^6$ ) cells were seeded onto 100 mm dishes. Twenty-four hours later, cells were transfected with 4 µg of HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6neo) molecular clones and increasing amount (0, 5, 50, 500ng) of ADAR1 expression plasmid (Polyfect, QIAGEN). Forty-height hours post-transfection, 293T cells were washed and co-cultured with reporter Jurkat-LTR-Luciferase (1:3 ratio) cells for 24 hours. Reporter activities were assayed using the luciferase reporter assay system (Promega) and normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

### Transfections with HTLV molecular clones

293T cells (3.10<sup>6</sup>) were seeded onto 100 mm dishes. The following day, 4  $\mu$ g of pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2) or SV2Neo (control) plasmids were transfected with or without 5, 50, 500 ng of ADAR1 using PolyFect reagent (QIAGEN) following manufacturer's instructions and cells were treated with increasing amount (0, 10, 100, 1000 U/mL) of IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio) for 48 hours. Reporter activity was assayed (Luciferase reporter assay system, Promega) and normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

Jurkat cells ( $10^6$ ) or PBL (5.  $10^5$ ) were transfected with 2 µg of the HTLV-1 or the HTLV-2-LTR-luciferase plasmids, 2 µg of the HTLV-1 (pACH) or HTLV-2 (pH6neo) molecular clones with or without 1 µg of the ADAR1 expression plasmid (Neon® Transfection System, Invitrogen) following manufacturer's instructions. Forty-eight hours later reporter activity was assayed (Luciferase reporter assay system, Promega). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method (Bio-Rad).

#### Fluorescence microscopy

293T-LTR-GFP cells were seeded at 5. 10<sup>5</sup> cells/well on 6-well plates. The next day, one microgram of the appropriate plasmid were transfected as described above, with or without 1.25, 12.5, or 125 ng of the ADAR plasmid. Two days later, cells were visualized and pictures were captured with a Zeiss Axio Vert.A1 imaging microscope.

### p19<sup>gag</sup> ELISA

Cell culture supernatants were collected 48 hours post-transfection and p19<sup>gag</sup> protein was quantified (Retrotek HTLV-1/2 p19 antigen ELISA, Zeptometrix) following the manufacturer's instructions.

#### **PKR silencing**

293T cells were seeded at a concentration of  $3.10^5$  cells per well onto 6-well plates. The following day, 20 nM of PKR siRNA (ON-TARGETplus SMART pool EIF2AK2, Fermentas) or control siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Fermentas) were transfected (HiPerfect reagent, QIAGEN) as previously described [11]. Twelve hours post-transfection, 1.2 µg of pACH or PH6neo plasmid were transfected together with 20 nM of siRNA and 125ng of ADAR1 (Attracten reagent, QIAGEN) following the manufacturer's instructions. Cells were collected 48 hours later and analyzed.

### Immunoblot analyses

Cells were washed with PBS, lysed (50 nM Tris-HCl pH 7.4, 150 nM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P-40, 0.2 mM Na3VO4, 50 mM NaF, 1 mM dithitheitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and protease inhibitors (Complete Roche Applied Science) as previously described [67]. Cell debris were pelleted by centrifugation. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad). Sixty micrograms of proteins were loaded onto 4-12% NUPAGE gels (NOVEX, Invitrogen), subjected to electrophoresis at 150V, and transferred onto a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blocked in a 5% milk-PBS-0.05% Tween 20 solution, then incubated overnight with the primary antibody (anti-ADAR1 (Abcam ab88574, 1:1000), anti-PKR 71/10 (1:500) [68], anti-phospho PKR (Epitomics #1120-1, 1:2000), anti-Tax-1-specific (Tab 172, 1:1000), anti-Tax-2 (GP3738, 1:4000), [17] anti-HTLV-1/2 p24 (Zeptometrix 75/4.21.11, 1:400), anti-β-actin clone AC74 (Sigma), 1:40000). The next day, membranes were washed and incubated either with anti-

rabbit or with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and developed using ECL Plus reagent kit (GE Healthcare).

### **COMPETING INTERESTS:**

The authors declare that they have no competing interests'.

### **AUTHORS'CONTRIBUTIONS**

AC, SA, NLK, AB, RS performed experiments. AC, SAC, NLK, JPV RM designed the experiments. AC, JPV, RM analyzed the data and wrote the manuscript.

### ACKNOWLEDGMENTS

RM, AC and AB are supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. RM is also supported by a Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle grant from INSERM. NLK was supported by the Croucher Foundation.

SAC was supported by InCa (Cancéropole CLARA). We acknowledge the support of ARC and of La Ligue Contre le Cancer (programme équipe labellisée).

We thank Dr L Ratner and Dr P Green for the gift of different plasmids and Dr H Dutartre and Dr C. Journo for their helpful comments. The figures were produced by Servier Medical Art.

### REFERENCES

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77:7415-7419.
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y: 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* 1982, 79:2031-2035.
- Gessain A, Cassar O: Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol 2012, 3:388.
- Takatsuki T: Adult T-cell leukemia in Japan. In *Topics in Hematology*. Edited by Seno S TS, Irino S. Amsterdam: Excerpta Medica; 1977: 73-77
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G: Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985, 2:407-410.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara
  M: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986, 1:1031-1032.
- Bartman MT, Kaidarova Z, Hirschkorn D, Sacher RA, Fridey J, Garratty G, Gibble J, Smith JW, Newman B, Yeo AE, Murphy EL: Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. *Blood* 2008, 112:3995-4002.
- Murphy EL, Fridey J, Smith JW, Engstrom J, Sacher RA, Miller K, Gibble J, Stevens J, Thomson R, Hansma D, et al: HTLV-associated myelopathy in a

cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology* 1997, **48:**315-320.

- Anupam R, Doueiri R, Green PL: The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Front Microbiol* 2013, 4:275.
- Bertazzoni U, Turci M, Avesani F, Di Gennaro G, Bidoia C, Romanelli MG: Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses* 2011, 3:541-560.
- Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, Journo C, Dutartre H, Mahieux R: Alpha Interferon Restricts Human T-Lymphotropic Virus Type
   1 and 2 De Novo Infection through PKR Activation. *J Virol* 2013, 87:13386-13396.
- Cavallari I, Rende F, Bender C, Romanelli MG, D'Agostino DM, Ciminale V: Fine tuning of the temporal expression of HTLV-1 and HTLV-2. Front Microbiol 2013, 4:235.
- Feuer G, Green PL: Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. Oncogene 2005, 24:5996-6004.
- 14. Higuchi M, Fujii M: Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* 2009, 6:117.
- 15. Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, Turpin J, Vinera J, Cote E, Chevalier SA, Kfoury Y, Bazarbachi A, Pique C, Mahieux R: Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J Virol* 2013, 87:1123-1136.

- Kannian P, Yin H, Doueiri R, Lairmore MD, Fernandez S, Green PL: Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. J Virol 2012, 86:3757-3766.
- Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, Mahieux R: 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 2004, 279:43307-43320.
- Romanelli MG, Diani E, Bergamo E, Casoli C, Ciminale V, Bex F, Bertazzoni
  U: Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV
  Tax proteins. *Front Microbiol* 2013, 4:271.
- Barbeau B, Mesnard JM: Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses* 2011, 3:456-468.
- Zane L, Jeang KT: The importance of ubiquitination and sumoylation on the transforming activity of HTLV Tax-1 and Tax-2. *Retrovirology* 2012, 9:103.
- 21. Journo C, Mahieux R: HTLV-1 and innate immunity. *Viruses* 2011, 3:1374-1394.
- 22. Samuel CE: ADARs: viruses and innate immunity. Curr Top Microbiol Immunol 2012, 353:163-195.
- Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K: Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:11457-11461.
- 24. Hogg M, Paro S, Keegan LP, O'Connell MA: RNA editing by mammalian ADARs. *Adv Genet* 2011, **73:**87-120.



- 25. Bass BL: RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem Sci* 1997, **22:**157-162.
- 26. Bass BL: RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. Annu Rev Biochem 2002, 71:817-846.
- 27. George CX, Samuel CE: Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:4621-4626.
- George CX, Wagner MV, Samuel CE: Expression of interferon-inducible RNA adenosine deaminase ADAR1 during pathogen infection and mouse embryo development involves tissue-selective promoter utilization and alternative splicing. *J Biol Chem* 2005, 280:15020-15028.
- Patterson JB, Samuel CE: Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol Cell Biol* 1995, 15:5376-5388.
- Samuel CE: Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology* 2011, 411:180-193.
- 31. Suspene R, Renard M, Henry M, Guetard D, Puyraimond-Zemmour D, Billecocq A, Bouloy M, Tangy F, Vartanian JP, Wain-Hobson S: Inversing the natural hydrogen bonding rule to selectively amplify GC-rich ADARedited RNAs. Nucleic Acids Res 2008, 36:e72.
- Gelinas JF, Clerzius G, Shaw E, Gatignol A: Enhancement of replication of RNA viruses by ADAR1 via RNA editing and inhibition of RNA-activated protein kinase. J Virol 2011, 85:8460-8466.

- Taylor DR, Puig M, Darnell ME, Mihalik K, Feinstone SM: New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. J Virol 2005, 79:6291-6298.
- 34. Zahn RC, Schelp I, Utermohlen O, von Laer D: A-to-G hypermutation in the genome of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 2007, 81:457-464.
- 35. Mohamed YM, Bangphoomi N, Yamane D, Suda Y, Kato K, Horimoto T, Akashi H: Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). Arch Virol 2014.
- 36. Li Z, Wolff KC, Samuel CE: RNA adenosine deaminase ADAR1 deficiency leads to increased activation of protein kinase PKR and reduced vesicular stomatitis virus growth following interferon treatment. *Virology* 2010, **396:**316-322.
- 37. Nie Y, Hammond GL, Yang JH: Double-stranded RNA deaminase ADAR1 increases host susceptibility to virus infection. *J Virol* 2007, 81:917-923.
- 38. Gandy SZ, Linnstaedt SD, Muralidhar S, Cashman KA, Rosenthal LJ, Casey JL: RNA editing of the human herpesvirus 8 kaposin transcript eliminates its transforming activity and is induced during lytic replication. J Virol 2007, 81:13544-13551.
- 39. Iizasa H, Wulff BE, Alla NR, Maragkakis M, Megraw M, Hatzigeorgiou A, Iwakiri D, Takada K, Wiedmer A, Showe L, et al: Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. J Biol Chem 2010, 285:33358-33370.
- 40. de Chassey B, Aublin-Gex A, Ruggieri A, Meyniel-Schicklin L, Pradezynski F, Davoust N, Chantier T, Tafforeau L, Mangeot PE, Ciancia C, et al: The

interactomes of influenza virus NS1 and NS2 proteins identify new host factors and provide insights for ADAR1 playing a supportive role in virus replication. *PLoS Pathog* 2013, **9:**e1003440.

- 41. Casey JL: RNA editing in hepatitis delta virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **307:**67-89.
- Casey JL, Bergmann KF, Brown TL, Gerin JL: Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:7149-7153.
- Jayan GC, Casey JL: Increased RNA editing and inhibition of hepatitis delta virus replication by high-level expression of ADAR1 and ADAR2. J Virol 2002, 76:3819-3827.
- 44. Suspene R, Petit V, Puyraimond-Zemmour D, Aynaud MM, Henry M, Guetard D, Rusniok C, Wain-Hobson S, Vartanian JP: Double-stranded RNA adenosine deaminase ADAR-1-induced hypermutated genomes among inactivated seasonal influenza and live attenuated measles virus vaccines. J Virol 2011, 85:2458-2462.
- 45. Ward SV, George CX, Welch MJ, Liou LY, Hahm B, Lewicki H, de la Torre JC, Samuel CE, Oldstone MB: RNA editing enzyme adenosine deaminase is a restriction factor for controlling measles virus replication that also is required for embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:331-336.
- 46. Cattaneo R, Billeter MA: Mutations and A/I hypermutations in measles virus persistent infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992, **176:**63-74.
- Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA: Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* 1988, 55:255-265.

- 48. Patterson JB, Cornu TI, Redwine J, Dales S, Lewicki H, Holz A, Thomas D, Billeter MA, Oldstone MB: Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease. *Virology* 2001, **291:**215-225.
- Toth AM, Li Z, Cattaneo R, Samuel CE: RNA-specific adenosine deaminase
  ADAR1 suppresses measles virus-induced apoptosis and activation of protein kinase PKR. J Biol Chem 2009, 284:29350-29356.
- Clerzius G, Gelinas JF, Daher A, Bonnet M, Meurs EF, Gatignol A: ADAR1 interacts with PKR during human immunodeficiency virus infection of lymphocytes and contributes to viral replication. *J Virol* 2009, 83:10119-10128.
- Doria M, Neri F, Gallo A, Farace MG, Michienzi A: Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:5848-5858.
- 52. Phuphuakrat A, Kraiwong R, Boonarkart C, Lauhakirti D, Lee TH, Auewarakul P: Double-stranded RNA adenosine deaminases enhance expression of human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol* 2008, 82:10864-10872.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM: A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011, 472:481-485.
- 54. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A: The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1mediated diseases. Front Microbiol 2012, 3:323.

- 55. Oliere S, Douville R, Sze A, Belgnaoui SM, Hiscott J: Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 2011, 22:197-210.
- 56. Suspene R, Henry M, Guillot S, Wain-Hobson S, Vartanian JP: Recovery of APOBEC3-edited human immunodeficiency virus G->A hypermutants by differential DNA denaturation PCR. J Gen Virol 2005, 86:125-129.
- 57. Ko NL, Birlouez E, Wain-Hobson S, Mahieux R, Vartanian JP: Hyperediting of human T-cell leukemia virus type 2 and simian T-cell leukemia virus type 3 by the dsRNA adenosine deaminase ADAR-1. J Gen Virol 2012, 93:2646-2651.
- Wucherpfennig KW, Hollsberg P, Richardson JH, Benjamin D, Hafler DA: Tcell activation by autologous human T-cell leukemia virus type l-infected T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:2110-2114.
- 59. Higuchi M, Single FN, Kohler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH: RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 1993, 75:1361-1370.
- Laxminarayana D, Khan IU, O'Rourke KS, Giri B: Induction of 150-kDa adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR)-1 gene expression in normal T lymphocytes by anti-CD3-epsilon and anti-CD28. *Immunology* 2007, 122:623-633.
- Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, Tortevoye P, Otrock Z, Taylor G, Gessain A, Harrington W, Panelatti G, Hermine O: 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* 2010, 28:4177-4183.

- 62. Delebecque F, Pramberger K, Prevost MC, Brahic M, Tangy F: A chimeric human T-cell lymphotropic virus type 1 with the envelope glycoprotein of Moloney murine leukemia virus is infectious for murine cells. *J Virol* 2002, 76:7883-7889.
- Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI: Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. Nat Med 2010, 16:83-89.
- Kimata JT, Wong FH, Wang JJ, Ratner L: Construction and characterization of infectious human T-cell leukemia virus type 1 molecular clones. *Virology* 1994, 204:656-664.
- 65. Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS, Miwa M, Sugimura T: Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82:3101-3105.
- Herbert A, Rich A: The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the in vivo editing of minimal substrates by ADAR1. *Proc Natl Acad Sci U* S A 2001, 98:12132-12137.
- 67. Halin M, Douceron E, Clerc I, Journo C, Ko NL, Landry S, Murphy EL, Gessain A, Lemasson I, Mesnard JM, et al: Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. *Blood* 2009, 114:2427-2438.
- 68. Laurent AG, Krust B, Galabru J, Svab J, Hovanessian AG: Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for



the detection of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**:4341-4345.

#### FIGURE LEGENDS

## Figure 1: ADAR1 is expressed in activated lymphocytes as well as in HTLV-1 and HTLV-2 chronically infected T-cell lines

(A): Whole cell extracts (60  $\mu$  g) obtained from PBLs activated or not with PHA/IL-2 for 72 hours. (B): uninfected (Jurkat), HTLV-1-infected (C91-PL, MT2) and HTLV-2-infected (C19, MO) were analyzed by western-blot analyses using anti-ADAR1 or anti-actin antibody.

## Figure 2: ADAR1 has a proviral effect on *de novo* HTLV-1 and HTLV-2 infection in T lymphocytes

(A): Jurkat or PBLs were transfected either with 2.5  $\mu$  g of an ADAR1 or of a backbone vector, together with 2.5  $\mu$  g of a plasmid encoding the luciferase gene under the control of the HTLV-1-LTR or HTLV-2-LTR. Twenty-four hours later, Jurkat (B, C) or PBLs (D, E) were co-cultured with (B, D) irradiated C91-PL (HTLV-1), (C, E) C19 (HTLV-2) or (B, C, D, E) Jurkat (non-infected) cells for 24 hours. Luciferase activity was measured, and results normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as fold change compared to infected cells transfected with the control plasmid arbitrarily set to 100%. (D, E): PBLs were treated with AZT (50  $\mu$  M) before the co-culture with C91-PL or C19 irradiated cells. (B, C): Data are the mean ± standard deviation (SD) from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student t test, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; NS: non significant). (D, E): Data are representative of two different experiments obtained with two different blood donors.

Figure 3: ADAR1 expression enhances HTLV-1 and HTLV-2 protein expression (A, B): Jurkat or (C, D) PBLs were transfected with (A, C) 2  $\mu$  g of pACH or (B, D) pH6neo molecular clones together with 1  $\mu$  g of a plasmid encoding ADAR1 and 2  $\mu$  g of (A, C) HTLV-1-LTR or (B, D) HTLV-2-LTR-luc plasmids. Forty-eight hours later, luciferase activity was measured and results normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as fold change compared to cells that were not transfected with ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%. (A, B): Data are the mean ± standard deviation (SD) from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student t test, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; NS: non significant). (C, D): Data are representative of two different experiments obtained with two different blood donors.

(E): 293-LTR-GFP cells were transfected with 1  $\mu$  g of pACH (HTLV-1) or pH6neo (HTLV-2) molecular clones together with 125 ng of an ADAR1 expression plasmid or of the backbone vector. Forty-eight hours later, cells were visualized and pictures taken with a Zeiss Axio Vert.A1 imaging microscope. (F, G, H, I): 293T cells were transfected with 4  $\mu$  g of (F, H) pACH (HTLV-1) or (G, I) pH6neo (HTLV-2) molecular clones and increasing amount (0, 5, 50, 500ng) of an ADAR1 expression plasmid. (F, G): Western blot analyses were performed on 60  $\mu$  g of proteins obtained from whole cell extracts using anti-gag p24, anti-Tax1, anti-Tax2 and anti-actin antibodies. (H, I): p19<sup>gag</sup> was quantified in the culture supernatants from cells transfected as in (F, G). Data are represented as fold change compared to the p19<sup>gag</sup> values obtained for cells that were not transfected with the ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%.

### Figure 4: ADAR1 expression does not affect viral infectivity

(A): 293T cells were transfected with 4  $\mu$  g of (B) pACH or (C) pH6neo molecular clones and increasing amount (0, 5, 50, 500 ng) of an ADAR1 expression plasmid or 8  $\mu$  g of (D) pSG5M-Tax1, (E) pSG5M-Tax2 or backbone vector. Forty-eight hours later, cells were washed and co-cultured with Jurkat-LTR-luc cells for 24 hours (ratio 1:3). Luciferase activity results were normalized to protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as fold change compared to cells non transfected with ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%. Data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student t test, \* p<0.05; NS: non significant).

## Figure 5: ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication independently from its editing activity

293T cells were transfected with (A, C) 4  $\mu$  g of pACH or (B, D) pH6neo molecular clones together with 500ng of a plasmid coding for ADAR1 wild-type or for an editingdeficient ADAR1 protein (ADAR1 mutant). (A, B): Western blot analyses were performed on 60  $\mu$  g of proteins obtained from whole cell extracts using anti-gag p24, anti-ADAR1 and anti-actin antibodies. (C, D): p19<sup>gag</sup> was quantified in supernatant obtained from cells transfected as in (A, B). Data are represented as fold change compared to the p19<sup>gag</sup> values obtained for cells that were not transfected with the ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%.

(E, F): Jurkat cells were transfected with 2  $\mu$  g of (E) pACH or (F) pH6neo molecular clones, together with 1  $\mu$  g of a plasmid encoding either ADAR1 wild-type or ADAR1 mutant and 2  $\mu$  g of (E) HTLV-1-LTR or (F) HTLV-2-LTR-luc plasmid. Forty-eight

hours later, luciferase activity was measured and results normalized to protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as fold change compared to cells non transfected with ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%.

(C-F): Data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student t test, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; NS: non significant).

## Figure 6: ADAR1 proviral effect is mediated through inhibition of PKR activation

293T cells were transfected with 4  $\mu$  g of (A) pACH or (B) pH6neo molecular clones and increasing amount (0, 5, 50, 500ng) of ADAR1 plasmid. Western blot analyses were performed on 60  $\mu$  g of proteins obtained from whole cell extracts using anti-ADAR1, anti-gag p24, anti-Tax1, anti-Tax2, anti-PKR, anti-phospho-PKR and antiactin antibodies. (C, D): 293T cells (3.10<sup>5</sup>) were transfected with siRNA directed against PKR (20nM) or with control siRNA. Twelve hours later cells were transfected with 20nM of the same siRNA together with 1.2  $\mu$  g of (C) pACH, (D) pH6neo and 125 ng of an ADAR1 expression plasmid. Western blot analyses were performed on 60  $\mu$  g of proteins obtained from whole cell extracts anti-gag p24, anti-PKR, anti-P-PKR and anti-actin antibodies.

# Figure 7: ADAR1 expression reverses IFN- $\alpha$ inhibitory effect on HTLV-1 and HTLV-2

293T cells were transfected with 4  $\mu$ g of (A) pACH or (B) pH6neo molecular clone. When required, 500ng of an ADAR1 expression plasmid were also transfected and

cells were treated with increasing amount of IFN- $\alpha$  (0-1000 U/mL) for 48 hours. Western blot analyses were performed on 60  $\mu$  g of proteins obtained from whole cell extracts using anti-ADAR1, anti-gag p24, anti-Tax1, anti-Tax2, anti-PKR, antiphospho-PKR and anti-actin antibodies.

## Supplementary Figure 1: Testing the editing capacity of ADAR1wt and ADAR1 mutant constructs.

293T cells were transfected with 150 ng of the 3XF-ADAR1 RNA editing reporter system with (left) 0, 150, 300, 600, 1000 ng of the plasmid coding for ADAR1 wildtype or with (right) 0, 150, 300, 600, 1000 ng of the plasmid encoding ADAR1 with a mutation in its catalytic site. Forty-eight hours later, luciferase activity was measured and results normalized to renilla expression and calculated as fold change compared to cells non transfected with ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%. Data are the mean ± standard deviation (SD) from 2 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated cells (paired Student t test, \* p<0.05; NS: non significant).

## Supplementary Figure 2: Viral particles produced in the presence of an editingdeficient ADAR1 are still infectious

293T cells were transfected with 4  $\mu$  g of (A) ACH or (B) pH6neo molecular clone together with 500ng of wild type or mutant ADAR1. Forty-eight hours later, cells were washed and co-cultured with Jurkat-LTR-luc cells for 24 hours (ratio 1:3). Luciferase activity was normalized by protein concentration as determined by the Bradford method and calculated as fold change compared to cells non transfected with ADAR1 plasmid arbitrarily set to 100%.

### Résultats Article 2





Figure 1







Figure 2

Résultats Article 2



*\/////* 

Backbone

vector

0

ADAR1:

HTLV-1

+

Backbone vector

+

HTLV-2

0 ADAR1:

Figure 3















Figure 5

vector

Résultats Article 2



D)

C)









Figure 6

### Résultats Article 2





C)





Figure 7

Résultats \_ Article 2



Figure 8

### Additional files provided with this submission:

Additional file 1: Supplem Figure 1.png, 119K http://www.retrovirology.com/imedia/1785645973127770/supp1.png Additional file 2: Supplem Figure 2.png, 115K http://www.retrovirology.com/imedia/1642756802127770/supp2.png

## 3. Résultats complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons montré que la protéine ADAR1, plus particulièrement la forme ADAR1-p150, stimule la réplication de HTLV-1 et HTLV-2. Nous avons obtenu grâce au docteur Antoine Gessain des cellules mononucléaires de sang périphérique d'individus asymptomatiques et de patients ATL ou HAM/TSP infectés par HTLV-1. Nous avons étudié l'expression de la protéine ADAR1 par western-blot dans les échantillons de ces patients (Figure 8). De façon intéressante, nous avons observé qu'un patient ATL surexprime les deux isoformes de ADAR1. Cependant certaines données, comme la charge provirale de ces patients, sont manquantes. L'étude d'une cohorte plus nombreuse de patients infectés par HTLV-1 pourrait être intéressante.



## Figure 8 : Expression de la protéine ADAR1 chez des patients infectés par HTLV-1

Analyse de l'expression de ADAR1 et de l'actine par western-blot sur 20 µg de protéines extraites d'une lignée de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 (C91PL) et de cellules mononucléaires de sang périphérique d'un individu non infecté (Non-infected), d'individus asymptomatiques infectés par HTLV-1 (AC) de patients HAM/TSP (HAM/TSP) et de patients ATL (ATL).

## <u>III. Résultats complémentaires : Les cellules infectées par HTLV-1 sont</u> <u>insensibles à l'IFN- $\alpha$ contrairement aux cellules infectées par HTLV-2</u>

## 1. Contexte de l'étude

HTLV-1 et HTLV-2 sont deux virus présentant une forte homologie dans leur organisation génomique et leur séquence nucléotidique. Pourtant HTLV-2 est moins pathogène que HTLV-1. En particulier, l'infection par HTLV-2 n'est pas associée à des désordres hématologiques malins. Dans l'introduction, nous avons évoqué que l'IFN- $\alpha$  pouvait avoir un rôle néfaste dans les infections par HCV, VIH-1 ou HPV qui comme HTLV-1 et HTLV-2 sont des virus qui peuvent persister dans l'organisme tout au long de la vie de l'individu. Nous avons mis en évidence que l'IFN- $\alpha$  peut participer à la sélection de cellules infectées résistantes d'une part et induire une inflammation chronique d'autre part. Nous nous sommes donc demandés si un rôle distinct de l'IFN- $\alpha$  dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2 pouvait être à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus.

Nous avons montré dans notre premier article, que l'infection de lymphocytes cibles par HTLV-1 et HTLV-2 était inhibée par un prétraitement à l'IFN- $\alpha$ . Dans cette dernière étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur des cellules une fois l'infection établie par les deux virus. Nous avons confirmé que des cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'IFN- $\alpha$ . Mais de façon intéressante, nous avons mis en évidence que des cellules infectées par HTLV-2 sont sensibles à un traitement à l'IFN- $\alpha$ . Une sensibilité distincte à l'IFN- $\alpha$  entre les cellules infectées par HTLV-1 et les cellules infectées par HTLV-2 pourrait être à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus.

## 2. Matériels et méthodes

## Culture cellulaire

Les cellules 293T sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) additionné de 10% de sérum de veau fétal (Gibco, Life Technologies) et 100  $\mu$ g/mL de pénicilline-streptomycine (Gibco, Life Technologies). Les cellules Jurkat, les lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 (C91-PL) ou HTLV-2 (C19) sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau fétal (Gibco, Life Technologies) et 100  $\mu$ g/mL de pénicilline-streptomycine (Gibco, Life Technologies). Toutes les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C-5% de CO<sub>2</sub>.

## Plasmides

Le clone moléculaire de HTLV-1 (pACH) a été décrit précédemment (Kimata *et al.*, 1994). Le clone moléculaire de HTLV-2 (pH6neo) et le plasmide SV2Neo ont été fournis par le Dr Green (Chen *et al.*, 1983, Shimotohno *et al.*, 1985). Les plasmides HTLV-1- et HTLV-2-LTR-luciferase ont été précédemment décrits (Journo *et al.*, 2013). Le plasmide pISREluciferase (PathDetect ISRE Cis-reporting system, Stratagene) a été fourni par le Dr Michallet.

## Infection par contact cellule-cellule

Des cellules Jurkat (10<sup>6</sup>) sont transfectées avec 5µg de HTLV-1- ou HTLV-2-LTRluciferase en utilisant le système de transfection Neon (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Vingt-quatre heures après les transfections, les cellules sont cocultivées avec des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 (C91-PL) ou HTLV-2 (C19) (ratio 3:1). Les C91-PL et C19 ont été irradiées au préalable (77 Gy) avec une source de <sub>137</sub>Cs (CIS BIO international ; IBL 637). Quarante-huit heures après la coculture les cellules sont traitées pendant 24 heures avec différentes doses (de 0 à 5000 U/mL) d'IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio). L'activité luciférase est ensuite mesurée en utilisant le système rapporteur de l'activité luciférase (Promega). L'activité luciférase est ensuite normalisée par la concentration protéique mesurée par la méthode du Bradford (Bio-Rad).

## Extraction d'ARN et RT-qPCR

Des cellules C91-PL ou C19 sont traitées avec différentes doses (de 0 à 5000 U/mL) d'IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio) pendant 24 heures. Les ARN sont ensuite extraits en utilisant le kit d'extraction d'ARN (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant et resuspendus dans 30µL d'eau. Avant la transcription inverse, les ARN sont traités avec 10U de DNase I (Qiagen) pendant 20 minutes à 27°C puis 15 minutes à 60°C. La transcription inverse est réalisée en utilisant le kit de synthèse d'ADNc iScript (Bio-Rad) en suivant les instructions du fabricant. Une PCR quantitative (qPCR) est faite par la suite en utilisant le EastStart Universal SYBR green Master (Roche) sur un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems). Les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à 95°C, 40 cycles sont réalisés ensuite (10 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C) suivis d'une courbe de dénaturation entre 60°C et 95°C. Les échantillons d'ADNc sont amplifiés avec les d'un à l'interféron (5'amorces gène de réponse connu. Mx1 AGCCACTGGACTGACGACTTG-3' (sens), 5'-AAATCACCACGGCTAACGGATAAG-3' (antisens)). Les amorces de la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (5'-

AGCCACATCGCTCAGACAC-3' (sens) and 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' (antisens)) sont utilisées pour la normalisation.

## Transfections avec les clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2 et analyse par western-Blot

Des 293T (3.10<sup>6</sup>) sont plaquées dans des boîtes 10 cm. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec 8µg de pACH (HTLV-1) ou pH6neo (HTLV-2) en utilisant le PolyFect (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont traitées avec différentes doses (0 à 1000 U/mL) d'IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio) pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite lavées au PBS, lysées (50 nM Tris-HCl, pH 7.4, 150 nM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P-40, 0.2 mM Na3VO4, 50m MNaF, 1mM dithiothreitol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) en présence d'inhibiteurs de protéase (Complete, Roche Applied Science) et incubées sur la glace. Les débris cellulaires sont culotés par centrifugation pendant 20 minutes puis la concentration protéique est déterminée par la méthode du Bradford (Bio-Rad). Soixante microgrammes de protéines sont chargés sur un gel 4-12% (Novex, Invitrogen) et soumis à électrophorèse à 150V, puis transférés sur une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) (Immobilon-P, Millipore). Les membranes sont saturées dans une solution de lait 5%-PBS-Tween 20 0,05% et incubées sur la nuit avec les anticorps primaires anti-Tax-1 (Tab 172; dilution, 1:4,000), anti-Tax-2 (GP3738; dilution, 1:4,000), anti-HTLV-1/2 p24 (Zeptometrix 75/4.21.11; 2.5  $\mu$ g/ml; dilution. 1:400), ou anti- $\beta$ -actine (clone AC74, Sigma; dilution, 1:40,000). Le jour suivant, les membranes sont lavées et incubées en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxidase de raifort anti-lapin ou antisouris puis développées avec le kit de révélation ECL Plus (GE Healthcare).

# Transfections avec les clones moléculaires de HTLV-1 et HTLV-2 et le plasmide plSRE-luciférase et mesure de l'activité luciférase

Des cellules 293T ( $5.10^5$  par puit) sont plaquées dans des plaques 6-puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec 500 ng du plasmide reporteur pISRE-luciferase et 1,5  $\mu$ g des clones pACH (HTLV-1), pH6neo (HTLV-2) et du vecteur vide SV2Neo. Quarantehuit heures après la transfection, les cellules sont traitées ou non avec 500 U/mL d'IFN- $\alpha$ 2a (Tebu-Bio) pendant 6 heures. L'activité luciférase est ensuite mesurée en utilisant le système rapporteur de l'activité luciférase (Promega).
#### 3. Résultats

### Les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'IFN- $\alpha$ contrairement aux cellules infectées par HTLV-2

Dans un article précédent (Cachat *et al.*, 2013), nous avons mis au point un système d'infection de lymphocytes par coculture avec des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 et HTLV-2. Les lymphocytes cibles sont au préalable transfectés avec un plasmide reporteur codant la luciférase sous le contrôle des promoteurs LTR de HTLV-1 ou HTLV-2. Les lymphocytes cibles sont ensuite cultivés avec des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Les lymphocytes cibles sont ensuite cultivés avec des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. La mesure de l'activité luciférase reflète l'infection des lymphocytes cibles, de l'entrée des virus à l'expression des protéines Tax1 et Tax2. Dans notre étude précédente, nous avons mis en évidence que les lymphocytes cibles, prétraités à l'IFN- $\alpha$ , étaient résistants à l'infection par HTLV-1 et HTLV-2. Nous nous sommes intéressés ici à l'effet de l'IFN- $\alpha$  une fois l'infection établie. Les lymphocytes Jurkat cibles sont alors cultivés avec les lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 (C91-PL) ou HTLV-2 (C19) pendant 48 heures afin de permettre l'infection. Puis les cellules sont traitées à l'IFN- $\alpha$  pendant 24 heures (Figure III.1.A).

L'activité luciférase dans les lymphocytes cibles cultivés avec les C91-PL ne diminue pas malgré le traitement à l'IFN- $\alpha$  (Figure III.1.B). Ainsi les lymphocytes infectés par HTLV-1 semblent insensibles au traitement par l'IFN- $\alpha$ . Au contraire, il y a une diminution dose-dépendante de l'activité luciférase dans les lymphocytes cible cultivés avec les C19 (Figure III.1.C). Contrairement aux lymphocytes infectés par HTLV-1, les cellules infectées par HTLV-2 sont sensibles au traitement à l'IFN- $\alpha$ .

Nous avons cherché à confirmer la différence de sensibilité entre les deux virus dans des cellules 293T transfectées par des clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2. Vingtquatre heures après la transfection, les cellules 293T sont traitées à l'IFN- $\alpha$  pendant 24 heures (Figure III.1.D). L'expression des protéines virales est analysée par western-blot. L'expression des protéines virales Tax1 et gag p24 reste stable dans les 293T transfectées par le clone moléculaire de HTLV-1 malgré le traitement à l'IFN- $\alpha$  (Figure III.1.E). Au contraire l'expression de Tax2 et de gag p24 diminue de façon dosedépendante dans les cellules 293T transfectées par le clone moléculaire de HTLV-2 et traitées à l'IFN- $\alpha$  (Figure III.1.F). Dans les deux cas, le niveau d'actine reste constant. Ainsi l'IFN- $\alpha$  semble inhiber l'expression des protéines de HTLV-2 dans les cellules infectées tandis que les cellules infectées par HTLV-1 sont insensibles au traitement.

#### **Résultats** Résultats complémentaires



### Figure III.1: Les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement exogène à l'IFN- $\alpha$ contrairement aux cellules infectées par HTLV-2

(A) Des lymphocytes Jurkat sont transfectés avec les plasmides reporteurs HTLV-1- ou HTLV-2-LTR-luciférase puis cocultivés avec des lymphocytes chroniquement infectés par (B) HTLV-1 (C91-PL) ou (C) HTLV-2 (C19) pendant 48 heures puis traités à l'IFN- $\alpha$  pendant 24 heures. (B-C) L'activité luciférase est normalisée par la concentration protéique et convertie en pourcentages, les résultats des cellules non traitées étant arbitrairement placés à 100%. Les données représentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à des différences entre les cellules traitées et non traitées statistiquement significatives (Test de Student pair, \*P<0,05, \*\*\*:P<0,001, NS : non significatif). (D) Des cellules 293T sont transfectées avec (E) le clone moléculaire de HTLV-1 (pACH) ou (F) le clone moléculaire de HTLV-2 (pH6neo). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont traitées à l'IFN- $\alpha$  pendant 24 heures. (E-F) Des analyses par western-blot sont réalisés (anti-gag p24, anti-Tax1, anti-Tax2 ou anti-actine) sur 60µg de protéines obtenues à partir des lysats des cellules transfectées.

### La voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$ est inhibée dans les cellules infectées par HTLV-1 mais pas dans les cellules infectées par HTLV-2

Afin de rechercher la cause de la résistance à l'IFN- $\alpha$  des cellules infectées par HTLV-1 en comparaison aux cellules infectées par HTLV-2, nous avons étudié dans un premier temps l'induction de l'expression d'un gène de réponse à l'IFN- $\alpha$ , Mx1, dans des lymphocytes chroniquement infectés par HTLV-1 (C91-PL) ou HTLV-2 (C19). Les cellules C91-PL ou C19 sont traitées pendant 24 heures avec différentes doses d'IFN- $\alpha$  (0 à 5000 U/mL). Les ARN sont ensuite extraits et l'expression du gène Mx1 est analysée par RT-qPCR. L'IFN- $\alpha$  induit l'expression du gène Mx1 dans les deux types cellulaires, mais l'induction est beaucoup plus faible dans les C91-PL (Figure III.2.A) que dans les C19 (Figure III.2.B). En effet, l'induction de l'expression du gène Mx1 n'est pas supérieure à 2,5 fois en présence de 5000 U/mL d'IFN- $\alpha$  dans des C91-PL alors qu'elle dépasse les 300 fois dans les C19 pour la même concentration d'IFN- $\alpha$ . Ainsi les cellules infectées par HTLV-1 induisent faiblement l'expression d'un ISG, Mx1, malgré la présence d'une forte dose d'IFN- $\alpha$ .

Dans le but de confirmer les résultats précédents dans un même type de cellules exprimant soit les protéines de HTLV-1 soit celles de HTLV-2, nous avons transfecté des cellules 293T avec les clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2 et un plasmide codant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur ISRE (Interferon-Sensitive-Response Element). Dans ce système, l'expression de la luciférase reflète l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse à l'IFN-a. L'objectif de l'expérience consiste à vérifier si la voie de signalisation Jak/STAT est fonctionnelle dans des cellules exprimant les protéines de HTLV-1 ou HTLV-2. Ainsi 48 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec 500 U/mL d'IFN-α pendant 6 heures (Figure III.2.C). L'activité luciférase est ensuite analysée. Dans des cellules 293T non infectées, l'activité luciférase est en moyenne 9 fois plus élevée en présence d'IFN- $\alpha$  (Figure III.2.D). Dans des 293T transfectées avec le clone moléculaire de HTLV-2, l'expression de la luciférase augmente d'environ 7 fois en présence d'IFN- $\alpha$  (Figure III.2.D). De façon cohérente avec les résultats précédents, l'activité luciférase augmente de 2-2,5 fois seulement en présence d'IFN- $\alpha$  dans des 293T transfectées par du clone moléculaire de HTLV-1 (Figure III.2.D). Ces résultats montrent que, dans des cellules exprimant les protéines de HTLV-1, la voie de réponse à l'IFN- $\alpha$  est peu fonctionnelle en comparaison à des cellules contrôles ou des cellules exprimant les protéines virales de HTLV-2. L'inhibition de la voie de réponse à l'IFN-α par HTLV-1 expliquerait la résistance des cellules infectées par HTLV-1 à un traitement exogène à l'IFN- $\alpha$  contrairement à des cellules infectées par HTLV-2.

**Résultats** Résultats complémentaires



### Figure III.2 : La voie de réponse à l'IFN- $\alpha$ est altérée dans des cellules infectées par HTLV-1 mais pas dans des cellules infectées par HTLV-2

Des cellules chroniquement infectées par (A) HTLV-1 (C91-PL) ou (B) HTLV-2 (C19) sont traitées pendant 24 heures avec différentes doses (0 à 5000 U/mL) d'IFN- $\alpha$ . L'expression du gène Mx1 est analysée par RT-qPCR à partir des ARN extraits de ces cellules et normalisée par l'expression du gène codant l'actine. Les résultats obtenus pour les cellules non traitées sont arbitrairement placés à 1. Les données correspondent à la moyenne et l'écart-type de 2 expériences indépendantes. (C-D) Des cellules 293T sont transfectées avec un plasmide reporteur pISRE-luciférase, les clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2 ou un vecteur vide. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont traitées ou non avec 500 U/mL d'IFN- $\alpha$  pendant 6 heures. L'activité luciférase est ensuite mesurée. Les données représentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les astérisques correspondent à des différences statistiquement significatives (Test de Student pair, \* : P<0,05, NS : non significatif).

#### 4. Perspectives

Ces résultats montrent une différence de sensibilité à un traitement à l'IFN- $\alpha$  entre des cellules déjà infectées par HTLV-1 et des cellules déjà infectées par HTLV-2. Les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement exogène à l'IFN- $\alpha$  probablement du fait d'une altération de la voie de réponse à l'IFN- $\alpha$ . La voie de réponse à l'IFN- $\alpha$  semble fonctionnelle dans les cellules infectées par HTLV-2 qui sont alors plus sensibles au traitement.

Il serait intéressant de vérifier la différence de sensibilité entre les deux virus dans des lymphocytes primaires humains infectés par coculture avec des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Par ailleurs, l'induction de l'expression de gènes de réponse à l'IFN- $\alpha$  autres que Mx1 pourrait être analysée dans différentes lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. L'expression des acteurs de la voie de signalisation à l'IFN- $\alpha$ , les chaînes du récepteur IFNAR1 et IFNAR2, les protéines Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2 et IRF-9 pourrait être étudiée dans ces différentes lignées. Il serait intéressant de vérifier l'altération de la voie de signalisation Jak/STAT dans des lymphocytes en transfectant le plasmide pISRE-luciférase dans des Jurkat ou dans des lymphocytes primaires humains et en infectant ces derniers par coculture avec des lignées chroniquement infectées par HTLV-1 ou HTLV-2. Enfin le mécanisme d'inhibition de la voie de réponse à l'IFN- $\alpha$  par HTLV-1 pourrait être recherché. Il est possible de surexprimer des protéines virales comme Tax ou HBZ et d'étudier si celles-ci induisent une inhibition de la voie de signalisation Jak/STAT. Cette étude pourra permettre de davantage appréhender la différence de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2.

# DISCUSSION

#### L'IFN- $\alpha$ inhibe l'infection de novo de lymphocytes par HTLV-1 et HTLV-2

L'IFN- $\alpha$  a été mis en évidence en 1957 par Isaacs et Lindenmann (Isaacs *et* Lindenmann, 1957). Ces derniers observent que le milieu de culture de cellules infectées par le virus de la grippe confère une résistance vis-à-vis de l'infection à des cellules nouvellement exposées au même virus. Caractérisé pour ses propriétés antivirales, l'IFN- $\alpha$  est utilisé seul ou combiné à d'autres drogues dans des études cliniques dans le but de traiter des patients chroniquement infectés par HBV, HPV, HCV et HTLV-1.

L'IFN- $\alpha$  seul n'induit pas de diminution de la charge provirale chez des patients atteints de la HAM/TSP, suggérant que les cellules infectées par HTLV-1 chez ces patients sont résistantes au traitement (Saito *et al.*, 2004). Une étude transcriptomique montre qu'un groupe de gènes de réponse à l'interféron (ISG) est surexprimé dans des monocytes et neutrophiles de patients HAM/TSP qui n'ont pas été traités par l'IFN- $\alpha$ (Tattermusch *et al.*, 2012). La surexpression de ces ISG est corrélée avec la sévérité de la maladie, ce qui peut suggérer que l'IFN- $\alpha$  participe au développement de la maladie.

Contrairement aux patients HAM/TSP, l'IFN- $\alpha$  en combinaison avec d'autres molécules comme l'AZT ou l'arsenic trioxide augmente la survie de patients atteints des formes chronique, progressive et leucémique aiguë de l'ATL (pour revue : Bazarbachi *et al.*, 2011). L'efficacité du traitement chez les patients ATL reste étonnante car elle paraît en désaccord avec les études montrant que les cellules chroniquement infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'IFN- $\alpha$  *in vitro* (Bazarbachi *et al.*, 1999, El-Sabban *et al.*, 2000, Mahieux *et al.*, 2001, Moens *et al.*, 2012). Plusieurs publications suggèrent de plus que certaines des protéines codées par le génome viral, comme Tax, sont capables d'inhiber la signalisation par les interférons de type I (Zhang *et al.*, 2008, Feng *et* Ratner, 2008). Les bases moléculaires justifiant l'utilisation de l'IFN- $\alpha$  dans le contexte d'une infection par HTLV-1 restent donc largement inconnues.

J'ai montré au cours de ma thèse qu'un traitement à l'IFN- $\alpha$  de lymphocytes T humains non infectés (lignées de lymphocytes et lymphocytes primaires issus de sang périphérique) inhibe l'infection par HTLV-1 et HTLV-2 (Figure 36). Etant donné que HTLV-1 et HTLV-2 se transmettent d'une cellule infectée à une cellule cible par un contact cellule-cellule, nous avons infecté les lymphocytes pré-traités à l'IFN- $\alpha$  en réalisant une co-culture avec des lignées de lymphocytes chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Notre modèle expérimental permet ainsi d'étudier l'effet d'un traitement à l'IFN- $\alpha$ sur une réelle infection. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Kinpara qui montre que l'IFN- $\beta$  produit par des cellules stromales réprime l'expression des protéines virales

187

dans des lignées de lymphocytes infectés dont la croissance dépend de l'interleukine-2 (Kinpara *et al.*, 2009).

Nous avons déterminé quelle étape du cycle viral est inhibée par l'IFN- $\alpha$ . Nous avons montré que l'IFN- $\alpha$  n'inhibe pas les étapes précoces du cycle viral de HTLV-1, de l'entrée à l'intégration. Au contraire, l'IFN- $\alpha$  inhibe les étapes tardives du cycle viral. L'activation de la protéine PKR lors de l'infection par HTLV-1 et HTLV-2 réprime la traduction des protéines virales à l'origine d'une diminution de la libération de particules virales infectieuses. De façon parallèle, Kinpara montre que des lymphocytes T infectés par HTLV-1 et dépendants de l'interleukine-2 sont sensibles à un traitement à l'IFN- $\alpha$  (Kinpara *et al.*, 2013). L'IFN- $\alpha$  induit dans ces cellules une diminution de l'expression de la protéine Tax à l'origine d'une diminution de la quantité d'ARNm codant les autres protéines virales. L'inhibition de l'expression des protéines virales n'a pas lieu en présence d'un inhibiteur de PKR. Ainsi nos travaux et ceux de Kinpara indiquent que l'inhibition de l'infection de lymphocytes par HTLV-1 et HTLV-2 est médiée en particulier via l'activation de la protéine PKR.

Des études ont précédemment montré que la tetherine inhibe le relargage des particules virales de HTLV-1 dans des cellules transfectées par du clone moléculaire de HTLV-1 ou un plasmide codant gag-pol (Feng *et al.*, 2003, Jouvenet *et al.*, 2009). Contrairement à PKR, HTLV-1 échapperait cependant *in vivo* à l'action antivirale médiée par la tetherine en se transmettant préférentiellement d'une cellule infectée à une cellule cible via un contact cellule-cellule (Ilinskaya *et al.*, 2013).

Contrairement à HTLV-1, l'IFN- $\alpha$  inhibe aussi les étapes précoces du cycle viral du VIH-1. En effet, différentes études montrent que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'accumulation et l'intégration de l'ADN viral du VIH-1 (Goujon *et al.*, 2010, Goujon *et al.*, 2013, Kane *et al.*, 2013). Récemment Mx2 a été identifiée comme une nouvelle protéine codée par un gène de réponse à l'interféron (ISG) responsable de l'inhibition des étapes précoces du VIH-1 (Goujon *et al.*, 2013, Kane *et al.*, 2013). Mx2 reconnaît la capside du VIH-1 et inhiberait l'import nucléaire du génome viral. IRF-1, IRF-2, IRF-7, MDA5, RIG-I, MAP3K14 et OASL sont les ISG les plus efficaces pour inhiber la réplication virale d'HCV (Schoggins *et al.*, 2011). Ils inhibent la traduction de 25 à 70 % durant les 4 premières heures après l'infection. Aucun des ISG n'affecte l'entrée du virus. Ainsi l'IFN- $\alpha$  induit un large panel d'ISG pouvant inhiber les cycles viraux à différentes étapes. Il apparaît que chaque virus est inhibé par une combinaison spécifique d'ISG.

Dans notre étude, l'inhibition de PKR restaure la traduction des protéines de HTLV-1 et HTLV-2, signifiant que l'activation de PKR est en majeure partie responsable de l'effet inhibiteur de l'IFN- $\alpha$ . Il pourrait être intéressant de chercher si d'autres protéines

codées par des ISG et s'ajoutant à PKR et à la tetherine sont impliquées dans l'inhibition des étapes tardives du cycle viral de HTLV-1 et HTLV-2. Par ailleurs, le mécanisme d'action de PKR pourrait être précisé. PKR est exprimée constitutivement à un niveau basal mais son expression est accrue par les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ). La protéine PKR est principalement activée par la présence d'ARN à caractère double-brin même si d'autres stimuli ont été décrits (stress oxydatif, agents polyanioniques, facteurs de croissance, protéines cellulaires comme les caspases), (pour revues : Munir et al., 2013, Pfaller et al., 2011, Pindel et Sadler, 2011). PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eif2a. De cette manière, PKR réprime la traduction des ARNm dont les ARNm viraux. PKR est aussi connue pour induire l'apoptose ou encore la formation de granules de stress. Excepté dans le cas d'une infection par HCV où PKR inhibe la traduction de l'IFN- $\beta$ , il a été récemment montré que PKR était aussi impliquée dans la synthèse d'IFNβ en stimulant l'activation de IRF-3 (pour revues : Munir et al., 2013, Pfaller et al., 2011, Pindel et Sadler, 2011). Il pourrait être intéressant d'étudier la phosphorylation du facteur eif2 $\alpha$  et l'induction ou la répression de la synthèse d'IFN- $\beta$  par PKR dans le contexte des infections par HTLV-1 et HTLV-2.



**Figure 36 : L'IFN-** $\alpha$  **inhibe l'infection** *de novo* **de lymphocytes par HTLV-1 (A.) et HTLV-2 (B.)** L'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection par HTLV-1 (A.) et HTLV-2 (B.) en activant la protéine PKR.

# La compréhension de l'effet de l'IFN- $\alpha$ sur l'infection par HTLV-1 : vers une amélioration des traitements des pathologies liées à HTLV-1 ?

L'inhibition grâce à l'IFN- $\alpha$  de la synthèse des protéines virales dans des lignées de lymphocytes infectés par HTLV-1 et dépendants de l'IL-2 (Kinpara et al., 2013) et dans des lymphocytes de novo infectés pourrait expliquer l'efficacité du traitement chez les patients atteints des formes chronique, progressive et leucémique de l'ATL. A la différence des lignées de lymphocytes chroniquement infectés qui sont résistantes à l'IFN-α (Bazarbachi et al., 1999, El-Sabban et al., 2000, Mahieux et al., 2001, Moens et al., 2012), les cellules des patients ATL expriment les protéines virales à un très faible niveau immédiatement après leur isolation (pour revue : Kannagi et al., 2012). De plus, l'IFN- $\alpha$  inhibe la ré-expression des protéines virales par ces cellules lorsque celles ci sont maintenues en culture ex vivo (Kinpara et al., 2013). Dans des cellules infectées par HTLV-1 et dépendantes de l'interleukine-2, l'IFN- $\alpha$  induit également un arrêt du cycle cellulaire et supprime l'activité NF-KB (Kinpara et al., 2013). Dans ces mêmes cellules, l'IFN-α combiné à l'AZT induit l'activation de p53 et l'apoptose (Kinpara et al., 2013). Il est possible d'imaginer que l'ensemble de ces mécanismes participe à l'efficacité du traitement combinant l'IFN- $\alpha$  à l'AZT chez les patients ATL. Contrairement aux patients ATL, l'expression de HTLV-1 est élevée chez les patients HAM/TSP à l'image des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 (pour revue : Kinpara et al., 2013), ce qui pourrait expliquer l'inefficacité du traitement à l'IFN- $\alpha$  chez ces patients.

Cependant, le traitement à l'IFN-α, combiné ou non à l'AZT et/ou à l'arsenic trioxide n'est pas efficace pour soigner les patients atteints de l'ATL lymphomateuse et de HAM/TSP et de nombreuses études sont à la recherche de traitements alternatifs. Une des alternatives pourrait consister à combiner l'AZT avec un inhibiteur d'histones désacétylases, le valproate (Afonso *et al.*, 2011). Le valproate active la transcription virale via le promoteur LTR (Lezin *et al.*, 2007). Le but du traitement combinant le valproate à l'AZT est d'induire la réplication virale sous l'effet du valproate ce qui stimule la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire de l'hôte ; de plus, l'AZT inhibe l'infection de nouvelles cellules en bloquant la transcriptase inverse. Ce traitement a été testé chez des singes asymptomatiques naturellement infectés par STLV-1, l'équivalent simien de HTLV-1 (Afonso *et al.*, 2011). La charge provirale des singes ainsi traités diminue pour atteindre une valeur très faible. Le traitement augmente également le nombre de lymphocytes T CD8+ dirigés contre Tax.

Etant donné que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection *de novo* de lymphocytes, il pourrait être intéressant de tester l'efficacité d'un traitement combinant l'IFN- $\alpha$  au valproate, à l'AZT et pourquoi pas à l'arsenic trioxide chez les patients. Le valproate stimulerait la réplication virale tandis que l'AZT et l'IFN- $\alpha$  inhiberaient de façon plus efficace l'infection de nouvelles cellules que l'AZT seul. De plus, la combinaison IFN- $\alpha$ /arsenic trioxide empêche l'activation constitutive de la voie NF-KB, entraîne une diminution de la quantité de protéine Tax1 et induit l'apoptose dans des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 *in vitro* (Bazarbachi *et al.*, 1999, EI-Sabban *et al.*, 2000, Mahieux *et al.*, 2001). La combinaison IFN- $\alpha$ , AZT, arsenic trioxide et valproate pourrait ainsi être efficace à la fois sur l'inhibition de l'infection de nouvelles cellules et sur les cellules déjà infectées. La compréhension de l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur l'infection par HTLV-1 pourrait ainsi permettre d'optimiser les traitements des patients atteints de l'ATL sous ses différentes formes et de la HAM/TSP.

### ADAR1, une protéine induite par l'IFN- $\alpha$ qui stimule la réplication de HTLV-1 et HTLV-2

Parmi les protéines codées par des gènes de réponse à l'interféron (ISG), certaines ont une activité pro-virale dans certains cas. Par exemple ADAR1 stimule la réplication de HCV, du VIH-1, du virus de la fièvre jaune, du virus de Chikungunya, du virus du Nil occidental ou encore du virus de l'encéphalite équine du Venezuela (Schoggins *et al.*, 2011). ADAR1 existe sous deux isoformes, ADAR1-p150 dont l'expression est induite par les interférons de type I et ADAR-p110 qui est constitutivement exprimée (pour revue : Samuel *et al.*, 2011). Les deux formes de ADAR1 catalysent la désamination de l'adénosine en inosine des ARN à caractère double brin. L'inosine est ensuite convertie en guanosine par les ribosomes et les ARN polymérases ARN dépendante. ADAR1 modifie ainsi la séquence et la structure de ces ARN. ADAR1-p110 est localisée de façon préférentielle dans le noyau tandis que ADAR1-p150 édite des ARN dans le noyau et dans le cytoplasme (pour revue : Samuel *et al.*, 2011).

L'expression exogène des deux isoformes de ADAR1 dans des cellules 293T cotransfectées avec un clone moléculaire de HTLV-2 induit l'éditing du génome viral (Ko *et al.*, 2012). *In vitro*, le génome de HTLV-2 est donc sensible à l'éditing catalysé par ADAR1 dans le cas où la protéine est surexprimée. Cependant, tandis que l'expression de

ADAR1 est détectée par RT-PCR dans des cellules mononucléaires de sang périphérique d'individus infectés par HTLV-2, l'éditing catalysé par ADAR1 semble être un événement extrêmement rare *in vivo* puisque aucune séquence éditée n'a été retrouvée dans les prélèvements obtenus de personnes infectées par ce virus (Ko *et al.*, 2012). Dans cette étude, l'éditing du génome de HTLV-1 par ADAR1 n'a pas été analysé. De plus, l'effet de ADAR1 sur la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 n'a jamais été recherché.

Nous avons tout d'abord montré que l'expression de ADAR1-p150 est induite à la suite de l'activation de lymphocytes de sang périphérique de donneurs sains par l'interleukine-2 et la phytohémagglutinine. Ces résultats sont en adéquation avec une étude montrant que ADAR1 est surexprimée dans des lymphocytes de sang périphérique humain activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Laxminaraya et al., 2007). Par ailleurs, ADAR1-p150 est surexprimée dans des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou HTLV-2 par comparaison avec des lignées de lymphocytes T non infectés. De plus, l'expression de ADAR1-p150 est détectée chez un patient ATL. ADAR1p150 est donc exprimée dans les cellules cibles de HTLV-1 et HTLV-2 ainsi que dans des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2. Ces données suggèrent que les infections par HTLV-1 ou HTLV-2 induisent l'expression de ADAR1. Il pourrait être intéressant de déterminer comment l'expression de ADAR1 est stimulée. L'expression de ADAR1-p150 pourrait être induite par les interférons de type I produit suite à l'infection. Tax1 et Tax2 pourraient également activer la transcription de ADAR1. Dans une lignée de lymphocytes, l'infection par VIH-1 induit l'expression des deux isoformes de ADAR1 (Clerzius et al., 2009). Or l'expression de ADAR1-p110 n'est pas dépendante des interférons de type I ce qui suggère qu'un mécanisme autre que la réponse interféron induite suite à l'infection par le VIH-1 est impliquée dans la surexpression de ADAR1.

Nous avons découvert que la surexpression de ADAR1 dans des lymphocytes T stimule l'infection de ces lymphocytes par coculture avec des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 et HTLV-2. La surexpression de ADAR1 dans des 293T transfectées avec des clones moléculaires de HTLV-1 et HTLV-2 augmente l'expression des protéines virales. Ces résultats sont en adéquation avec les autres études montrant un effet pro-viral de ADAR1 (Schoggins *et al.*, 2011, Phuphuakrat *et al.*, 2008, Nie *et al.*, 2007). Cependant, l'effet pro-viral de ADAR1 est contesté pour certains virus comme l'hépatite D, le virus de la grippe et le virus de la rougeole (pour revue : Samuel *et al.*, 2011). Par exemple, la cytotoxicité induite par le virus de la rougeole est accrue dans des lignées de fibroblastes embryonnaires murins n'exprimant pas ADAR1-p150 suggérant un rôle antiviral de ADAR1-p150 dans ces conditions. Au contraire, la cytotoxicité est réduite dans des cellules humaines HeLa déficientes pour les deux isoformes de ADAR1. Selon

les lignées cellulaires, les résultats expérimentaux obtenus sont donc contradictoires. (pour revue : Samuel *et al.*, 2011). Concernant le virus de l'hépatite D, ADAR1 catalyse l'éditing d'un codon stop en un codon tryptophane, autorisant l'expression de la protéine virale HDAg-L nécessaire à la formation des particules virales. Cependant, l'induction de l'expression de ADAR1-p150 par un traitement à l'IFN- $\alpha$  réprime la réplication du virus de l'hépatite D (pour revue : Samuel *et al.*, 2011). Ainsi ADAR1 faiblement exprimée semble avoir un effet pro-viral tandis que fortement exprimée ADAR1 aurait un effet antiviral sur la réplication du virus de l'hépatite D.

Nous avons montré que l'effet pro-viral de ADAR1 sur la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 est corrélé à l'inhibition de l'activation de PKR et est indépendant de l'activité éditing. Un effet pro-viral de ADAR1 via l'inhibition de PKR est également décrit pour le virus de la stomatite vésiculaire (pour revue : Gélinas et al., 2011). Concernant le VIH-1, plusieurs études s'opposent. Une première étude montre que ADAR1, via son activité éditing, stimule l'expression des protéines virales (Phuphuakrat et al., 2008). De plus, des particules virales du VIH-1 produites dans des cellules où ADAR1 est surexprimée sont plus infectieuses que des particules produites dans des cellules avec une forme de ADAR1 déficiente pour son activité désaminase (Doria et al., 2008). Une troisième étude montre que ADAR1 inhibe PKR et stimule la réplication du VIH-1 indépendamment de son activité catalytique (Clerzius et al., 2009). Ainsi il est probable que l'éditing et l'inhibition de PKR soient tous deux impliqués dans la stimulation de la réplication du VIH-1 par ADAR1 contrairement à HTLV-1 et HTLV-2 où seule l'inhibition de PKR entre en jeu. Le génome du VIH-1 est peut être plus sensible à l'éditing de ADAR1 que les génomes de HTLV-1 et HTLV-2. De plus, l'éditing sur des sites spécifiques du génome du VIH-1 pourrait rendre les particules virales plus infectieuses (Doria et al., 2008).

Dans le cas du virus de la rougeole, l'effet pro-viral de ADAR1 se manifeste également par l'inhibition de la synthèse d'IFN-β, l'inhibition de l'apoptose et de la formation de granules de stress dans les cellules infectées (Toth et al., 2009, Li et al., 2012, Okonski et al., 2013). Il pourrait être intéressant d'étudier si l'effet pro-viral de ADAR1 sur HTLV-1 et HTLV-2 se manifeste autrement que par la réversion de l'inhibition de la synthèse des protéines virales par PKR.

193

#### La dualité ADAR1-PKR, un rôle dans la persistance de l'infection ?

Nous avons mis en évidence que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection par HTLV-1 ou HTLV-2, en particulier via l'activation de PKR. Par ailleurs, l'infection par HTLV-1 ou HTLV-2 semble induire l'expression de ADAR1 qui réprimerait l'activation de PKR. De plus ADAR1 est exprimée dans les cellules cibles de HTLV-1 et HTLV-2. Nous nous sommes demandés quel était le rôle de l'IFN- $\alpha$  sur l'infection par HTLV-1 et HTLV-2 quand ADAR1 est surexprimée. Dans ces conditions, nous avons montré que la surexpression de ADAR1 réprime l'effet inhibiteur de l'IFN- $\alpha$  sur la réplication de HTLV-1 et HTLV-2. Une balance entre les taux d'expression de ADAR1 et PKR pourrait influencer l'issue de l'infection par les deux virus (Figure 37).

In vitro, l'expression et l'activation de PKR ont été suivies lors de l'infection d'une lignée de lymphocytes T par le VIH-1 (Clerzius et al., 2009). PKR est détectée sous sa forme phosphorylée, donc activée, jusqu'à 6 jours après l'infection. La quantité de protéine PKR phosphorylée diminue des jours 8 à 10 et n'est plus observée à partir du jour 12. La diminution du taux de PKR phosphorylée est concomitante avec l'augmentation de l'expression de ADAR1-p150 d'une part et l'activation de l'expression virale et de la production de particules virales d'autre part. Cette étude suggère que l'inhibition de la réplication virale par PKR lors de la primo-infection est réprimée dans un second temps via l'expression de ADAR1 (Clerzius et al., 2009). Une étude similaire est difficilement réalisable pour HTLV-1 et HTLV-2 : en effet, les particules virales libres sont très peu infectieuses. Il serait nécessaire d'infecter les lymphocytes cibles par co-culture avec des lymphocytes chroniquement infectés puis d'effectuer un tri cellulaire pour analyser l'activation de PKR et l'expression de ADAR1-p150 uniquement dans les lymphocytes cibles. Il serait aussi intéressant de suivre les niveaux d'expression de ADAR1 et de PKR in vivo au cours de l'infection. Cependant, la primo-infection par HTLV-1 ou HTLV-2 est asymptomatique. Il est donc très difficile de détecter et de suivre des individus infectés dès la primo-infection. L'utilisation de modèles animaux comme les souris humanisées (Annexe 2) serait une alternative pour suivre le déroulement de l'infection.

Par ailleurs, différentes études montrent que ADAR1 est impliquée dans l'inhibition de la réponse interféron de type I (IFN-I). La répression inductible de ADAR1 chez la souris est associée à une augmentation de la réponse IFN-I, à l'origine de l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques (Hartner *et al.*, 2009). Les cellules souches hématopoïétiques murines déficientes pour ADAR1 surexpriment certaines ISG comme STAT1, STAT2, IRF-7, IRF-9, Mx1, Mx2 ou encore PKR. Chez l'Homme, des mutations

de ADAR1, notamment au niveau du domaine catalytique, sont à l'origine du syndrôme d'Aicardi-Gouttières, une maladie inflammatoire caractérisée par une augmentation de la production d'IFN- $\alpha$  (Rice *et al.*, 2012). Les patients avec des mutations dans le gène codant ADAR1 montrent une surexpression des ISG dans les cellules mononucléaires de sang périphérique. Ainsi ADAR1 apparaît comme un régulateur négatif de la réponse interféron de type I.

En inhibant l'activation de PKR d'une part et en en réprimant globalement la réponse interféron de type I d'autre part, ADAR1 pourrait être impliquée dans la persistance des infections par HTLV-1 et HTLV-2.



#### Figure 37 : La dualité ADAR1-PKR au cours d'une infection par HTLV-1 ou HTLV-2

ADAR1 réprime l'action inhibitrice de l'IFN- $\alpha$  sur les infections par HTLV-1 et HTLV-2 en inhibant l'activation de PKR. Une balance entre le taux d'expression de ADAR1 et la phosphorylation de PKR (P-PKR) pourrait influencer l'issue de l'infection par les deux virus.

# Un rôle différent de l'IFN- $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2 : une implication dans la différence de pathogénicité entre les deux virus ?

Alors que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection *de novo* de lymphocytes par HTLV-1, plusieurs études montrent que l'IFN- $\alpha$  n'est pas efficace sur des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 (Bazarbachi *et al.*, 1999, El-Sabban *et al.*, 2000, Mahieux *et al.*, 2001, Moens *et al.*, 2012). Nous avons donc comparé l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur des cellules infectées par HTLV-1 et des cellules infectées par HTLV-2. Nous avons infecté des lymphocytes par coculture avec des cellules chroniquement infectées par HTLV-2. Un traitement à l'IFN- $\alpha$  une fois l'infection établie réprime la réplication de HTLV-2 mais pas de HTLV-1. Par ailleurs, des cellules 293T ont aussi été transfectées par des clones moléculaires de HTLV-1 ou HTLV-2. Un traitement à l'IFN- $\alpha$  24 heures après la transfection induit une diminution des protéines de HTLV-2 mais pas de HTLV-1. Ces résultats confirment que les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'IFN- $\alpha$  tandis que les cellules infectées par HTLV-2 semblent sensibles au traitement.

Une étude précédente a montré que la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  est inhibée dans des 293T transfectées par du clone moléculaire de HTLV-1 (Feng et Ratner, 2008). L'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  est dans ce cas associée à une diminution de la phosphorylation de Tyk2 et STAT1. Nous avons donc comparé l'activation de la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  dans des cellules infectées par HTLV-1 ou HTLV-2. Nous avons découvert que l'activation de l'expression de Mx1, un gène de réponse à l'IFN-a, est plus de 100 plus élevée dans une lignée de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-2 que dans des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en analysant l'expression de plusieurs gènes de réponse à l'interféron et en vérifiant l'expression des ARN codant les protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  (IFNAR1, IFNAR2, Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2 et IRF-9) dans plusieurs lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1 ou par HTLV-2. Par ailleurs, nous avons confirmé que la voie de signalisation de l'IFN-a est réprimée dans des cellules 293T transfectées par du clone moléculaire de HTLV-1 tandis qu'elle n'est pas altérée dans des 293T transfectées par du clone moléculaire de HTLV-2. Il serait intéressant d'identifier le mécanisme à l'origine de l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  par HTLV-1. Il est possible d'étudier si la surexpression d'une protéine virale, par exemple Tax1, inhibe la phosphorylation de Tyk2 et STAT1.

Ainsi l'IFN- $\alpha$  exerce un rôle différent sur les infections par HTLV-1 et HTLV-2. Alors que l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection de cellules cibles par les deux virus, les cellules déjà infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement à l'IFN- $\alpha$ , tandis que les cellules infectées par HTLV-2 restent sensibles au traitement (Figure 38). Il serait intéressant de vérifier ce modèle *in vivo* par exemple chez les souris humanisées. Il serait possible dans ce modèle d'étudier si un pré-traitement des souris à l'IFN- $\alpha$  réprime les infections par HTLV-1 et par HTLV-2. Il serait également envisageable d'étudier si un traitement à l'IFN- $\alpha$  de souris infectées par HTLV-2 induit une diminution de la charge provirale alors qu'un traitement similaire n'aurait pas d'effet sur des souris infectées par HTLV-1.



### Figure 38 : Modèle hypothétique liant l'effet distinct de l'IFN- $\alpha$ sur les infections par HTLV-1 (A.) et HTLV-2 (B.) à la différence de pathogénicité entre les deux virus

2 à 7% des individus infectés par HTLV-1 développent la leucémie à cellules T de l'adulte. Au contraire, l'infection par HTLV-2 n'est pas associée au développement de leucémie et est asymptomatique dans 99% des cas. L'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection *de novo* de lymphocytes par HTLV-1 et HTLV-2. Cependant les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à un traitement à l'IFN- $\alpha$  contrairement aux cellules infectées par HTLV-2. Une résistance à l'IFN- $\alpha$  des cellules infectées par HTLV-1 pourrait être à l'origine du développement de la leucémie à cellules T de l'adulte chez certains patients.

Un rôle différent de l'IFN- $\alpha$  sur les infections par HTLV-1 et HTLV-2 pourrait être impliqué dans la différence de pathogénicité entre les deux virus. L'IFN- $\alpha$  exercerait une pression de sélection négative *in vivo* et favoriserait la survie des clones de cellules infectées par HTLV-1 les plus résistants (Figure 39). Comme pour HPV, l'IFN- $\alpha$ , en favorisant l'émergence de cellules résistantes, serait alors impliqué dans le développement de l'ATL. Il serait intéressant d'étudier si une production d'IFN- $\alpha$  persiste au cours de l'infection par HTLV-1 de façon similaire aux infections par le VIH-1 ou HCV. Des données montrent déjà l'existence d'une signature IFN-I chez les patients HAM/TSP en comparaison aux individus asymptomatiques (Tattermusch *et al.*, 2012). Il serait possible de rechercher si une réponse IFN-I persistante est détectée chez les patients qui développent une ATL, tandis que des individus asymptomatiques n'auraient pas de réponse IFN-I persistante. La persistance de la réponse IFN- $\alpha$  chez certains individus infectés par HTLV-1 pourrait être impliquée dans la sélection de cellules résistantes et le développement de l'ATL d'une part, ou dans l'établissement d'une inflammation chronique à l'origine de la HAM/TSP d'autre part (Figure 39).

De la même façon que pour HTLV-1 et HTLV-2, il existe une différence de pathogénicité entre le VIH-1 et le VIH-2. En effet, la majorité des individus infectés par le VIH-2 ne progressent pas vers la phase SIDA ou seulement après une longue période asymptomatique. De plus, les individus infectés par le VIH-2 ont une virémie plus faible que les individus infectés par le VIH-1. De façon intéressante, un effet distinct de l'IFN- $\alpha$ sur les infections par le VIH-1 et le VIH-2 semble impliqué dans la différence de pathogénicité entre les deux virus (Cordeil et al., 2013, .Manuscrit de thèse de S. Cordeil). En effet, l'IFN- $\alpha$  inhibe l'infection de macrophages primaires humains par VIH-2, tandis que l'infection par le VIH-1 est moins sensible au traitement. Contrairement à HTLV-1 qui semble inhiber la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$ , VIH-1 est moins sensible que le VIH-2 à l'inhibition des étapes précoces du cycle viral par l'IFN- $\alpha$  (Cordeil *et al.*, 2013). Dans le cas d'une infection par le VIH-1, la virémie est haute du fait de la résistance du virus à l'IFN- $\alpha$ . En réponse à la virémie élevée, la réponse IFN- $\alpha$  persiste et devient délétère. Dans le cas du VIH-2, la sensibilité du virus à l'IFN-α permet de contrôler la réplication virale. Un contrôle plus efficace de l'infection n'induirait pas de réponse IFN- $\alpha$  persistante et délétère (Manuscrit de thèse de S. Cordeil).

HHV-6 existe sous deux variants, A et B. Le variant B provoque des encéphalites et la roséole, maladie caractérisée par une forte fièvre et des éruptions cutanées. De façon intéressante, le variant B est plus pathogène que le variant A. Comme dans le cas de HTLV-1 et HTLV-2, un traitement à l'IFN- $\alpha$  avant l'infection par HHV-6A ou HHV-6B

198

inhibe l'infection *de novo* par les deux variants tandis qu'un traitement post-infection est moins efficace sur HHV-6B (Jaworska *et al.*, 2010). Cette étude montre que HHV-6B code une protéine appelée IE1 qui séquestre STAT2 dans le noyau. Ainsi du fait de l'expression de la protéine virale IE1, HHV-6B inhibe la voie de signalisation des interférons de type I.



#### Figure 39 : Rôle ambivalent de l'IFN- $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2

La résistance des cellules infectées par HTLV-1 à l'IFN- $\alpha$  pourrait être impliquée dans la sélection de cellules résistantes et le développement de l'ATL d'une part et la mise en place d'une inflammation chronique et le développement de la HAM/TSP d'autre part. Les cellules infectées par HTLV-2 sont au contraire sensibles à l'IFN- $\alpha$  : il y aurait un équilibre entre la réplication virale et la réponse IFN- $\alpha$ .

## La différence de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2 : une histoire de coévolution hôte-pathogène ?

Au cours de ma thèse, j'ai essayé de comprendre les bases moléculaires à l'origine de la différence de pathogénicité entre deux virus présentant de fortes homologies, HTLV-1 et HTLV-2. La question pourrait s'élargir ainsi : pourquoi certains virus sont à l'origine de maladies chez l'Homme alors que d'autres sont très peu voire pas pathogènes. En effet, certains virus infectent une grande partie de la population et sont très rarement à l'origine de maladie. HHV-7 et EBV infectent 90% de la population. Les maladies associées à l'infection par ces virus se développent dans de rares cas uniquement. De même, l'infection par CMV est asymptomatique dans 90% des cas.

Comme nous l'avons illustré dans l'introduction avec l'exemple de la réponse interféron de type I, les maladies provoquées par des infections virales reposent souvent sur la réponse immune de l'hôte face à l'infection (A. Hosmalin *et al.*, Le système immunitaire et les virus, Panorama de la virologie sous la direction d'A. Saïb). Existe-il une différence entre la réponse immunitaire induite face aux infections par des virus à l'origine de maladies et des virus non pathogènes ?

L'équivalent simien du VIH, le SIV, n'est pas pathogène dans la plupart des cas chez son hôte naturel. Au cours de la primo-infection par le SIV, le VIH-1 ou le VIH-2, l'Homme et le Singe développent une forte réponse IFN-I. Chez le Singe, la réponse IFN-I est transitoire. Il y a ensuite un équilibre entre la réponse IFN-I et la réplication virale. De même lors de l'infection asymptomatique par le VIH-2. Au contraire, il y a un déséquilibre chez l'Homme infecté par le VIH-1 avec une forte réponse IFN-I persistante qui devient délétère comme nous l'avons évoqué précédemment (Manuscrit de thèse de S. Cordeil). De même, un équilibre est établi lors des infections par des herpesvirus : lors des phases latentes, les virus s'expriment faiblement et n'induisent pas de réponse immunitaire forte ; lors des phases de réactivation, les virus s'expriment plus fortement induisant une réponse immunitaire à l'origine d'un retour à un état d'équilibre. Une balance entre la réplication virale et la réponse immunitaire est donc observée au cours d'une infection virale. Un déséquilibre de cette balance est associé au développement de maladies. Pourquoi les infections par des virus non pathogènes, comme le SIV chez ses hôtes naturels, sont associées à un équilibre entre réplication et réponse immunitaire alors que les virus pathogènes induisent un déséguilibre de cette balance ?

L'équilibre entre la réplication virale et la réponse immunitaire pourrait être le résultat d'une coévolution entre l'hôte et le pathogène c'est à dire d'une adaptation du virus à son hôte, et de l'hôte à son pathogène. SIV persiste malgré la réponse IFN-I

induite lors de la primo-infection montrant l'adaptation du virus à son hôte. En revanche, l'hôte naturel du SIV tolère la réplication virale montrant l'adaptation de l'hôte au virus (Manuscrit de thèse de S. Cordeil). Une émergence récente d'un virus chez l'Homme serait à l'origine de maladies du fait de l'absence d'adaptation de l'hôte au virus et viceversa. Pour soutenir cette hypothèse, il est intéressant de chercher les dates des premières émergences de virus pathogènes et non pathogènes chez l'Homme. Les virus influenza à l'origine de la grippe se modifient rapidement à l'origine de l'émergence continue de nouvelles souches infectant l'Homme (pour revue : Taubenberger et al., 2010). Le virus Ebola à l'origine de fièvres hémorragiques aurait émergé pour la première fois chez l'Homme en 1976 (pour revue : Feldmann et al., 2002). L'introduction du groupe majeur du VIH-1 chez l'Homme daterait des années 1930 (pour revue : Sharp et al., 2002). La divergence entre le virus de la rougeole infectant l'Homme et le virus de la peste bovine daterait des 11<sup>ème</sup>-12<sup>ème</sup> siècles (Furuse *et al.*, 2010). HCV aurait divergé il y a 500-2000 ans contre 3000 ans pour HBV mais ces données sont débattues (pour revue : Simmonds, 2001). Les ancêtres des herpesvirus auraient infecté l'ancêtre commun des Mammifères ; chaque virus aurait évolué en fonction de son hôte (pour revue : Sharp et al., 2002). Les herpesvirus ont ainsi une longe histoire de coévolution avec leur hôte. Or les infections par ces virus sont souvent asymptomatiques.

Une longue période de coévolution entre le virus et son hôte pourrait permettre d'atteindre un équilibre entre réplication virale et réponse immunitaire. Cet équilibre s'opposerait au développement de maladies dues à l'infection. La divergence entre HTLV-2 et son équivalent simien STLV-2 est datée à environ 400 000 ans tandis que la divergence entre HTLV-1 et STLV-1 est datée à 93 000 ans environ (pour revue : Vandamme *et al.*, 2000). La différence de pathogénicité entre les deux virus pourrait-elle être due à une coévolution plus longue entre l'Homme et HTLV-2 qu'entre l'Homme et HTLV-1 ?

# BIBLIOGRAPHIE

- Abad-Fernandez, M., C. Cabrera, et al. (2014). "Transient increment of HTLV-2 proviral load in HIV-1-co-infected patients during treatment intensification with raltegravir." <u>J Clin Virol</u> **59**(3): 204-207.
- Abel, K., M. J. Alegria-Hartman, et al. (2002). "The relationship between simian immunodeficiency virus RNA levels and the mRNA levels of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and IFNalpha/beta-inducible Mx in lymphoid tissues of rhesus macaques during acute and chronic infection." J Virol **76**(16): 8433-8445.
- Afonso, P. V., M. Mekaouche, et al. (2010). "Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors." Blood **116**(19): 3802-3808.
- Afonso, P. V., S. Ozden, et al. (2008). "Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection." <u>PLoS Pathog</u> **4**(11): e1000205.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." <u>Cell</u> **124**(4): 783-801.
- Ambrus, J. L., B. J. Poiesz, et al. (1989). "Interferon and interferon inhibitor levels in patients infected with varicella-zoster virus, acquired immunodeficiency syndrome, acquired immunodeficiency syndrome-related complex, or Kaposi's sarcoma, and in normal individuals." Am J Med 87(4): 405-407.
- Amsler, L., M. C. Verweij, et al. (2013). "The tiers and dimensions of evasion of the type I interferon response by human cytomegalovirus." <u>J Mol Biol</u> **425**(24): 4857-4871.
- Anupam, R., R. Doueiri, et al. (2013). "The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle." <u>Front Microbiol</u> **4**: 275.
- Araujo, A. and W. W. Hall (2004). "Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease." <u>Ann Neurol **56**(1):</u> 10-19.
- Araujo, A. Q. and M. T. Silva (2006). "The HTLV-1 neurological complex." Lancet Neurol 5(12): 1068-1076.
- Arnaud, N., S. Dabo, et al. (2010). "Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation." <u>PLoS One</u> **5**(5): e10575.
- Arnold, J., B. Yamamoto, et al. (2006). "Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1." <u>Blood</u> **107**(10): 3976-3982.
- Arpin-Andre, C. and J. M. Mesnard (2007). "The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells." <u>J Biol Chem</u> 282(45): 33132-33141.
- Asquith, B., A. J. Mosley, et al. (2005). "A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load." J Gen Virol **86**(Pt 5): 1515-1523.
- Bai, X. T. and C. Nicot (2012). "Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis." Front Microbiol **3**: 400.
- Bai, X. T., U. Sinha-Datta, et al. (2012). "Nuclear export and expression of human T-cell leukemia virus type 1 tax/rex mRNA are RxRE/Rex dependent." J Virol **86**(8): 4559-4565.
- Banerjee, P., R. Rochford, et al. (2007). "Proinflammatory cytokine gene induction by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Tax in primary human glial cells." <u>J Virol</u> 81(4): 1690-1700.
- Bangham, C. R., L. B. Cook, et al. (2013). "HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and nonmalignant HTLV-1 infection." <u>Semin Cancer Biol</u>.
- Bangham, C. R. and M. Osame (2005). "Cellular immune response to HTLV-1." <u>Oncogene</u> **24**(39): 6035-6046.
- Barnard, A. L., T. Igakura, et al. (2005). "Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes." <u>Blood</u> **106**(3): 988-995.
- Barnard, P., E. Payne, et al. (2000). "The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha." <u>Virology</u> **277**(2): 411-419.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." <u>Science</u> 220(4599): 868-871.
- Bartman, M. T., Z. Kaidarova, et al. (2008). "Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection." <u>Blood</u> **112**(10): 3995-4002.
- Bazarbachi, A., M. E. El-Sabban, et al. (1999). "Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells." <u>Blood</u> **93**(1): 278-283.
- Bazarbachi, A., Y. Plumelle, et al. (2010). "Meta-analysis on the use of zidovudine and interferonalfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic

subtypes." <u>J Clin Oncol</u> **28**(27): 4177-4183.

- Bazarbachi, A., F. Suarez, et al. (2011). "How I treat adult T-cell leukemia/lymphoma." <u>Blood</u> **118**(7): 1736-1745.
- Beignon, A. S., K. McKenna, et al. (2005). "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions." J Clin Invest **115**(11): 3265-3275.
- Bertazzoni, U., M. Turci, et al. (2011). "Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences." <u>Viruses</u> **3**(5): 541-560.
- Bierle, C. J., K. M. Semmens, et al. (2013). "Double-stranded RNA binding by the human cytomegalovirus PKR antagonist TRS1." <u>Virology</u> **442**(1): 28-37.
- Biggar, R. J., M. E. Taylor, et al. (1996). "Genetic variants of human T-lymphotrophic virus type II in American Indian groups." <u>Virology</u> **216**(1): 165-173.
- Bigger, C. B., B. Guerra, et al. (2004). "Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees." <u>J Virol</u> 78(24): 13779-13792.
- Bisson, S. A., A. L. Page, et al. (2009). "A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein that forms inhibitory complexes with type I interferon receptor subunits, Jak and STAT proteins, and blocks interferon-mediated signal transduction." J Virol **83**(10): 5056-5066.
- Biswas, H. H., Z. Kaidarova, et al. (2010). "Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection." <u>J Acquir Immune Defic Syndr</u> 54(3): 290-296.
   Biswas, H. H., J. W. Engstrom, et al. (2009). "Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-
- Biswas, H. H., J. W. Engstrom, et al. (2009). "Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-IIinfected individuals without overt myelopathy." Neurology **73**(10): 781-789.
- Bode, J. G., S. Ludwig, et al. (2003). "IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3." <u>FASEB J</u> **17**(3): 488-490.
- Borg, A., J. A. Yin, et al. (1996). "Successful treatment of HTLV-1-associated acute adult T-cell leukaemia lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation." <u>Br J Haematol</u> 94(4): 713-715.
- Boxus, M., J. C. Twizere, et al. (2008). "The HTLV-1 Tax interactome." Retrovirology 5: 76.
- Boxus, M. and L. Willems (2009). "Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation." <u>Br J</u> <u>Cancer</u> **101**(9): 1497-1501.
- Buimovici-Klein, E., M. Lange, et al. (1983). "Is presence of interferon predictive for AIDS?" <u>Lancet</u> **2**(8345): 344.
- Busca, A. and A. Kumar (2014). "Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection." Virol J **11**(1): 22.
- Cachat, A., S. A. Chevalier, et al. (2013). "Alpha Interferon Restricts Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and 2 De Novo Infection through PKR Activation." <u>J Virol</u> **87**(24): 13386-13396.
- Calattini, S., S. A. Chevalier, et al. (2005). "Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa." <u>Retrovirology</u> **2**: 30.
- Cao, W., L. Bover, et al. (2009). "Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction." J Exp Med **206**(7): 1603-1614.
- CDC, N. C. f. I. D. (2009). "Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis, http://www.cdc.gov/epstein-barr/index.html."
- Chang, W. L. and P. A. Barry (2010). "Attenuation of innate immunity by cytomegalovirus IL-10 establishes a long-term deficit of adaptive antiviral immunity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **107**(52): 22647-22652.
- Chang, Y. E., L. Pena, et al. (2002). "Long-term effect of interferon on keratinocytes that maintain human papillomavirus type 31." <u>J Virol</u> **76**(17): 8864-8874.
- Charoenthongtrakul, S., Q. Zhou, et al. (2011). "Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS1." J Virol **85**(14): 6955-6962.
- Chen, J., M. Wu, et al. (2013). "Hepatitis B virus polymerase impairs interferon-alpha-induced STA T activation through inhibition of importin-alpha5 and protein kinase C-delta." <u>Hepatology</u> 57(2): 470-482.
- Cheng, G., J. Zhong, et al. (2006). "Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virusinfected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **103**(22): 8499-8504.
- Chevalier, S. A., S. Durand, et al. (2012). "The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties." <u>PLoS One</u> **7**(7): e41003.
- Chevalier, S. A., J. Turpin, et al. (2014). "Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and

viral transmission." PLoS Pathog 10(2): e1003917.

- Cimarelli, A., C. A. Duclos, et al. (1996). "Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load." <u>Virology</u> **223**(2): 362-364. Clerzius, G., J. F. Gelinas, et al. (2009). "ADAR1 interacts with PKR during human
- Clerzius, G., J. F. Gelinas, et al. (2009). "ADAR1 interacts with PKR during human immunodeficiency virus infection of lymphocytes and contributes to viral replication." <u>J Virol</u> **83**(19): 10119-10128.
- Clerzius, G., J. F. Gelinas, et al. (2011). "Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication." Rev Med Virol **21**(1): 42-53.
- Cockerell, G. L., J. Rovnak, et al. (1996). "A deletion in the proximal untranslated pX region of human T-cell leukemia virus type II decreases viral replication but not infectivity in vivo." <u>Blood</u> 87(3): 1030-1035.
- Colisson, R., L. Barblu, et al. (2010). "Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells." <u>Blood</u> **115**(11): 2177-2185.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." <u>Nat Immunol</u> **5**(12): 1219-1226.
- Cook, L. B., M. Elemans, et al. (2013). "HTLV-1: persistence and pathogenesis." Virology **435**(1): 131-140.
- Cordeil, S., X. N. Nguyen, et al. (2013). "Evidence for a different susceptibility of primate lentiviruses to type I interferons." J Virol 87(5): 2587-2596.
- Cordeil, S., Etude de la différence de susceptibilité des lentivirus de primates aux Interférons de type I, manuscrit de thèse, 2012
- Currer, R., R. Van Duyne, et al. (2012). "HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways." <u>Front Microbiol</u> **3**: 406.
- Dabo, S. and E. F. Meurs (2012). "dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection." <u>Viruses</u> **4**(11): 2598-2635.
- Dalloul, A., E. Oksenhendler, et al. (2004). "Severe herpes virus (HSV-2) infection in two patients with myelodysplasia and undetectable NK cells and plasmacytoid dendritic cells in the blood." J Clin Virol **30**(4): 329-336.
- Daud, II, M. E. Scott, et al. (2011). "Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence." Int J Cancer **128**(4): 879-886.
- de The, G. and R. Bomford (1993). "An HTLV-I vaccine: why, how, for whom?" <u>AIDS Res Hum</u> <u>Retroviruses</u> **9**(5): 381-386.
- Dion, M. L., J. F. Poulin, et al. (2004). "HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation." <u>Immunity</u> **21**(6): 757-768.
- Donaghy, H., L. Bosnjak, et al. (2009). "Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection." J Virol **83**(4): 1952-1961.
- Donegan, E., H. Lee, et al. (1994). "Transfusion transmission of retroviruses: human Tlymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1." <u>Transfusion</u> **34**(6): 478-483.
- Doria, M., F. Neri, et al. (2009). "Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection." Nucleic Acids Res **37**(17): 5848-5858.
- Douceron, E., Z. Kaidarova, et al. (2012). "HTLV-2 APH-2 expression is correlated with proviral load but APH-2 does not promote lymphocytosis." J Infect Dis **205**(1): 82-86.
- Douceron E., Découverte et caractérisation de la protéine APH-2, codée par le brin antisens du HTLV-2,manuscrit de thèse, 2011
- Dreux, M., U. Garaigorta, et al. (2012). "Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity." <u>Cell Host Microbe</u> **12**(4): 558-570.
- Duan, X. Z., H. Zhuang, et al. (2005). "Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2)." <u>J Gastroenterol</u> <u>Hepatol</u> 20(2): 234-242.
- Dube, M., C. Paquay, et al. (2011). "HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface." <u>Traffic</u> **12**(12): 1714-1729.
- Dupuis, S., E. Jouanguy, et al. (2003). "Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency." <u>Nat Genet</u> **33**(3): 388-391.
- Dutrieux, J., V. Fabre-Mersseman, et al. (2014). "Modified interferon-alpha subtypes production and chemokine networks in the thymus during acute simian immunodeficiency virus infection, impact on thymopoiesis." <u>AIDS</u>.
- Eiraku, N., P. Novoa, et al. (1996). "Identification and characterization of a new and distinct

molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2." <u>J Virol</u> **70**(3): 1481-1492.

- El Hajj, H., M. El-Sabban, et al. (2010). "Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia." J Exp Med **207**(13): 2785-2792.
- El-Sabban, M. E., R. Nasr, et al. (2000). "Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation." <u>Blood</u> **96**(8): 2849-2855.
- Endo, K., A. Hirata, et al. (2002). "Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax." J Virol **76**(6): 2648-2653.
- Fall, L. S., J. P. M'Bika, et al. (1995). "Biological effect of active anti-IFN alpha immunization in HIVinfected patients." <u>Biomed Pharmacother</u> **49**(9): 422-428.
- Feldmann, H., M. Czub, et al. (2002). "Emerging and re-emerging infectious diseases." <u>Med</u> <u>Microbiol Immunol</u> **191**(2): 63-74.
- Feng, X., N. V. Heyden, et al. (2003). "Alpha interferon inhibits human T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts." <u>J Virol</u> **77**(24): 13389-13395.
- Feng, X. and L. Ratner (2008). "Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon alpha." <u>Virology</u> **374**(1): 210-216.
- Feuer, G. and P. L. Green (2005). "Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2." Oncogene **24**(39): 5996-6004.
- Flint S.J., E. L. W., Racaniello V.R., Skala A.M. (2009). Principles of Virology.
- Fried, M. W. and S. J. Hadziyannis (2004). "Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin." <u>Semin Liver Dis</u> **24 Suppl 2**: 47-54.
- Furuse, Y., A. Suzuki, et al. (2010). "Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries." Virol J **7**: 52.
- Gabet, A. S., V. Moules, et al. (2006). "Endemic versus epidemic viral spreads display distinct patterns of HTLV-2b replication." <u>Virology</u> **345**(1): 13-21.
- Galao, R. P., A. Le Tortorec, et al. (2012). "Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses." <u>Cell Host Microbe</u> **12**(5): 633-644.
- Gallo, R. C. (2005). "History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2." Oncogene **24**(39): 5926-5930.
- Gallo, R. C. (1985). "Human T-cell leukemia (lymphotropic) retroviruses and their causative role in T-cell malignancies and acquired immune deficiency syndrome." <u>Cancer</u> 55(10): 2317-2323.Garaigorta, U. and F. V. Chisari (2009). "Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation." <u>Cell Host Microbe</u> 6(6): 513-522.
- Gaudray, G., F. Gachon, et al. (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**(24): 12813-12822.
- Gelinas, J. F., G. Clerzius, et al. (2011). "Enhancement of replication of RNA viruses by ADAR1 via RNA editing and inhibition of RNA-activated protein kinase." J Virol **85**(17): 8460-8466.
- Gessain, A., F. Barin, et al. (1985). "Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis." Lancet **2**(8452): 407-410.
- Gessain, A. and O. Cassar (2012). "Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection." <u>Front Microbiol</u> **3**: 388.
- Gessain, A. and R. Mahieux (2000). "[Epidemiology, origin and genetic diversity of HTLV-1 retrovirus and STLV-1 simian affiliated retrovirus]." <u>Bull Soc Pathol Exot</u> **93**(3): 163-171.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, et al. (2010). "Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex." <u>Retrovirology</u> **7**: 99.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, et al. (2006). "Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry." J Virol 80(14): 6844-6854.
- Gillet, N. A., G. Gutierrez, et al. (2013). "Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection." <u>PLoS Pathog</u> 9(10): e1003687.
- Gillet, N. A., N. Malani, et al. (2011). "The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones." <u>Blood</u> **117**(11): 3113-3122.
- Glynn, S. A., E. L. Murphy, et al. (2000). "Laboratory abnormalities in former blood donors seropositive for human T-lymphotropic virus types 1 and 2: a prospective analysis." <u>Arch</u> <u>Pathol Lab Med</u> **124**(4): 550-555.
- Goubau, P., M. Van Brussel, et al. (1994). "A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (Papio hamadryas)." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 91(7): 2848-2852.

- Goujon, C. and M. H. Malim (2010). "Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells." <u>J Virol</u> **84**(18): 9254-9266.
- Goujon, C., O. Moncorge, et al. (2013). "Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection." <u>Nature</u> **502**(7472): 559-562.
- Grassmann, R., S. Berchtold, et al. (1992). "Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture." J Virol **66**(7): 4570-4575.
- Grigsby, I. F., W. Zhang, et al. (2010). "Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stochiometry." <u>Retrovirology</u> **7**: 75.
- Grinde, B. (2013). "Herpesviruses: latency and reactivation viral strategies and host response." J Oral Microbiol **5**.
- Hakki, M., E. E. Marshall, et al. (2006). "Binding and nuclear relocalization of protein kinase R by human cytomegalovirus TRS1." J Virol **80**(23): 11817-11826.
- Halin, M., E. Douceron, et al. (2009). "Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription." <u>Blood</u> **114**(12): 2427-2438.
- Hall, W. W., H. Takahashi, et al. (1992). "Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II." J Virol **66**(4): 2456-2463.
- Hanon, E., J. C. Stinchcombe, et al. (2000). "Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I." Immunity **13**(5): 657-664.
- Harris, L. D., B. Tabb, et al. (2010). "Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques." <u>J Virol</u> 84(15): 7886-7891.
- Hartner, J. C., C. R. Walkley, et al. (2009). "ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling." <u>Nat Immunol</u> **10**(1): 109-115.
- Hasan, U. A., E. Bates, et al. (2007). "TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16." J Immunol **178**(5): 3186-3197.
- Hasegawa, H., H. Sawa, et al. (2006). "Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I." <u>Nat Med</u> **12**(4): 466-472.
- He, B., M. Gross, et al. (1997). "The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A 94(3)</u>: 843-848.
- Hebner, C. M., R. Wilson, et al. (2006). "Human papillomaviruses target the double-stranded RNA protein kinase pathway." <u>J Gen Virol</u> **87**(Pt 11): 3183-3193.
- Herbeuval, J. P. and G. M. Shearer (2007). "HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad." <u>Clin Immunol</u> **123**(2): 121-128.
- Herdman, M. T., M. R. Pett, et al. (2006). "Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants." <u>Carcinogenesis</u> **27**(11): 2341-2353.
- Hervas-Stubbs, S., J. L. Perez-Gracia, et al. (2011). "Direct effects of type I interferons on cells of the immune system." <u>Clin Cancer Res</u> **17**(9): 2619-2627.
- Higuchi, M. and M. Fujii (2009). "Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis." <u>Retrovirology</u> **6**: 117.
- Higuchi, M., C. Tsubata, et al. (2007). "Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line." J Virol **81**(21): 11900-11907.
- Hishizawa, M., K. Imada, et al. (2004). "Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals." Br J Haematol **125**(5): 568-575.
- Honda, K. and T. Taniguchi (2006). "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors." <u>Nat Rev Immunol</u> **6**(9): 644-658.
- Hornef, M. W., H. J. Wagner, et al. (1995). "Cytokine production in a whole-blood assay after Epstein-Barr virus infection in vivo." Clin Diagn Lab Immunol **2**(2): 209-213.
- Horner, S. M. and M. Gale, Jr. (2013). "Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus." Nat Med **19**(7): 879-888.
- Hosmalin, A. e. a. (2013). "Le système immunitaire et les virus, Panorama de la virologie sous la direction d'Ali Saïb."

- Huch, J. H., A. L. Cunningham, et al. (2010). "Impact of varicella-zoster virus on dendritic cell subsets in human skin during natural infection." J Virol 84(8): 4060-4072.
- Igakura, T., J. C. Stinchcombe, et al. (2003). "Spread of HTLV-I between lymphocytes by virusinduced polarization of the cytoskeleton." <u>Science</u> **299**(5613): 1713-1716.
- Ijichi, S., M. B. Ramundo, et al. (1992). "In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II)." J Exp Med **176**(1): 293-296.
- Ilinskaya, A., D. Derse, et al. (2013). "Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction." <u>Virology</u> **436**(1): 201-209.
- Imai, M., M. Higuchi, et al. (2013). "Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells." <u>Virus Genes</u> 46(1): 39-46.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-267.
- Isaacs, A., J. Lindenmann, et al. (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc <u>R Soc Lond B Biol Sci</u> **147**(927): 268-273.
- Ito, T., Y. H. Wang, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9." <u>Springer Semin</u> <u>Immunopathol</u> **26**(3): 221-229.
- Ivashkiv, L. B. and L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." <u>Nat Rev</u> <u>Immunol</u> **14**(1): 36-49.
- Iwanaga, M., T. Watanabe, et al. (2010). "Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan." <u>Blood</u> **116**(8): 1211-1219.
- Iwanaga, M., T. Watanabe, et al. (2012). "Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence." <u>Front Microbiol</u> **3**: 322.
- Iwasaki, A. (2012). "Innate immune recognition of HIV-1." Immunity 37(3): 389-398.
- Izumo, S., I. Goto, et al. (1996). "Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial." <u>Neurology</u> **46**(4): 1016-1021.
- Jacobson, S., H. Shida, et al. (1990). "Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease." Nature **348**(6298): 245-248.
- Janvier, K., A. Pelchen-Matthews, et al. (2011). "The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation." PLoS Pathog 7(2): e1001265.
- Javier, R. T. (2008). "Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses." Oncogene 27(55): 7031-7046.
- Jaworska, J., A. Gravel, et al. (2010). "Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **107**(18): 8369-8374.
- Jin, Q., L. Agrawal, et al. (2006). "GLUT-1-independent infection of the glioblastoma/astroglioma U87 cells by the human T cell leukemia virus type 1." <u>Virology</u> **353**(1): 99-110.
- Johnson, K. E., B. Song, et al. (2008). "Role for herpes simplex virus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling." <u>Virology</u> 374(2): 487-494.
  Johnson, J. M., R. Harrod, et al. (2001). "Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell
- Johnson, J. M., R. Harrod, et al. (2001). "Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1)." Int J Exp Pathol 82(3): 135-147.
- Jones K, P.-S. C., C Bertolette D, Enam N, K Bagni R, MR Jensen S, Davis D, Yarchoan R and W Ruscetti F (2014). "Different routes of entry of HTLV-1 during infection of primary dendritic cells and CD4+ T cells." <u>Retrovirology</u>.
- Jones, K. S., K. Fugo, et al. (2006). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells." <u>J Virol</u> **80**(17): 8291-8302.
- Jones, K. S., S. Lambert, et al. (2011). "Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors." <u>Viruses</u> 3(6): 794-810.
- Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, et al. (2008). "Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells." <u>Nat Med</u> **14**(4): 429-436.
- Journo, C., A. Bonnet, et al. (2013). "Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO." J Virol **87**(2): 1123-1136.
- Journo, C. and R. Mahieux (2011). "HTLV-1 and innate immunity." Viruses 3(8): 1374-1394.
- Jouvenet, N., S. J. Neil, et al. (2009). "Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin." J Virol 83(4): 1837-1844.
- Kajiyama, W., S. Kashiwagi, et al. (1986). "Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus." J Infect Dis **154**(5): 851-857.

- Kalyanaraman, V. S., M. G. Sarngadharan, et al. (1982). "A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia." <u>Science</u> 218(4572): 571-573.
- Kane, M., S. S. Yadav, et al. (2013). "MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection." <u>Nature</u> **502**(7472): 563-566.
- Kang, W., P. S. Sung, et al. (2014). "Hepatitis C Virus Attenuates Interferon-Induced MHC Class I Expression and Decreases CD8 T-Cell Effector Functions." <u>Gastroenterology</u>.
- Kannagi, M., A. Hasegawa, et al. (2012). "The roles of acquired and innate immunity in human Tcell leukemia virus type 1-mediated diseases." Front Microbiol **3**: 323.
- Kannagi, M., H. Shida, et al. (1992). "Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells." J Virol 66(5): 2928-2933.
- Kannian, P., S. Fernandez, et al. (2013). "Human T lymphotropic virus type 1 SU residue 195 plays a role in determining the preferential CD4+ T cell immortalization/transformation tropism." J Virol **87**(16): 9344-9352.
- Kannian, P. and P. L. Green (2010). "Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis." <u>Viruses</u> **2**(9): 2037-2077.
- Kannian, P., H. Yin, et al. (2012). "Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion." <u>J Virol</u> 86(7): 3757-3766.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "Antiviral signaling through pattern recognition receptors." J Biochem **141**(2): 137-145.
- Kchour, G., R. Rezaee, et al. (2013). "The combination of arsenic, interferon-alpha, and zidovudine restores an "immunocompetent-like" cytokine expression profile in patients with adult T-cell leukemia lymphoma." <u>Retrovirology</u> **10**: 91.
- Kim, U., T. L. Garner, et al. (1994). "Purification and characterization of double-stranded RNA adenosine deaminase from bovine nuclear extracts." <u>J Biol Chem</u> **269**(18): 13480-13489.
- Kimata, J. T., F. H. Wong, et al. (1994). "Construction and characterization of infectious human Tcell leukemia virus type 1 molecular clones." <u>Virology</u> **204**(2): 656-664.
- Kinpara, S., A. Hasegawa, et al. (2009). "Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon." <u>J Virol</u> 83(10): 5101-5108.
- Kinpara, S., M. Kijiyama, et al. (2013). "Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells." <u>Retrovirology</u> **10**: 52.
- Klatt, N. R., N. T. Funderburg, et al. (2013). "Microbial translocation, immune activation, and HIV disease." Trends Microbiol **21**(1): 6-13.
- Ko, N. L., E. Birlouez, et al. (2012). "Hyperediting of human T-cell leukemia virus type 2 and simian T-cell leukemia virus type 3 by the dsRNA adenosine deaminase ADAR-1." <u>J Gen Virol</u> **93**(Pt 12): 2646-2651.
- Komurian, F., F. Pelloquin, et al. (1991). "In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies." <u>J Virol</u> **65**(7): 3770-3778.
- Koyanagi, Y., Y. Itoyama, et al. (1993). "In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells." <u>Virology</u> **196**(1): 25-33.
- Kuhlmann, A. S., J. Villaudy, et al. (2007). "HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)." <u>Retrovirology</u> 4: 92.
- Kuroda, Y., K. Kurohara, et al. (1992). "Systemic interferon-alpha in the treatment of HTLV-Iassociated myelopathy." <u>Acta Neurol Scand</u> **86**(1): 82-86.
- Lahaye, X., T. Satoh, et al. (2013). "The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells." <u>Immunity</u> **39**(6): 1132-1142.
- Laurent, A. G., B. Krust, et al. (1985). "Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for the detection of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4341-4345.
- Lavanchy, D. (2004). "Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures." J Viral Hepat **11**(2): 97-107.
- Lavanchy, D. (2009). "The global burden of hepatitis C." Liver Int 29 Suppl 1: 74-81.
- Laxminarayana, D., I. U. Khan, et al. (2007). "Induction of 150-kDa adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR)-1 gene expression in normal T lymphocytes by anti-CD3-epsilon and anti-CD28." <u>Immunology</u> **122**(4): 623-633.

- Lazarenko, L. M., O. E. Nikitina, et al. (2014). "Development of biomarker panel to predict, prevent and create treatments tailored to the persons with human papillomavirus-induced cervical precancerous lesions." <u>EPMA J</u> **5**(1): 1.
- LeBreton M., S. W., Djoko C., Gillis A., Jia H., Sturgeon M., Shankar A., Zheng H., Nkeunen G., Tamoufe U., Nana A., Le Doux Diffo J., Tafon B., Kiyang J., Schneider B., Burke D., Wolfe N. (2014). "A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4." <u>Emerging</u> Microbes & Infections **3**.
- Legendre, M., J. Bartoli, et al. (2014). "Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Lemasson, I., M. R. Lewis, et al. (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription." J Virol **81**(4): 1543-1553.
- Lepelley, A., S. Louis, et al. (2011). "Innate sensing of HIV-infected cells." <u>PLoS Pathog</u> 7(2): e1001284.
- Levy, D. E., I. Marie, et al. (2002). "Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7mediated positive feedback." J Interferon Cytokine Res 22(1): 87-93.
- Lezin, A., N. Gillet, et al. (2007). "Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients." <u>Blood</u> **110**(10): 3722-3728.
- Li, S., S. Labrecque, et al. (1999). "The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha." <u>Oncogene</u> **18**(42): 5727-5737.
- Li, J., K. Liu, et al. (2013). "Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity." <u>Nat Immunol</u> **14**(8): 793-803.
- Li, K., E. Foy, et al. (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(8): 2992-2997.
- Li, Z., K. M. Okonski, et al. (2012). "Adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) suppresses the induction of interferon by measles virus." J Virol **86**(7): 3787-3794.
- Lustig, A. and A. J. Levine (1992). "One hundred years of virology." J Virol 66(8): 4629-4631.
- Lwoff, A. (1957). "The concept of virus." <u>J Gen Microbiol</u> **17**(2): 239-253.
- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, et al. (1992). "Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation." <u>AIDS Res Hum Retroviruses</u> **8**(9): 1699-1706.
- Machuca, A., B. Rodes, et al. (2001). "The effect of antiretroviral therapy on HTLV infection." <u>Virus</u> <u>Res</u> **78**(1-2): 93-100.
- Macnamara, A., A. Rowan, et al. (2010). "HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection." PLoS Pathog **6**(9): e1001117.
- MacQuillan, G. C., C. Mamotte, et al. (2003). "Upregulation of endogenous intrahepatic interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection." <u>J Med Virol</u> **70**(2): 219-227.
- Mahieux, R. (2011). "[Virological aspects of HTLV-1 infection and new therapeutical concepts]." Bull Soc Pathol Exot **104**(3): 181-187.
- Mahieux, R. and A. Gessain (2011). "HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects." <u>Viruses</u> **3**(7): 1074-1090.
- Mahieux, R., J. Pecon-Slattery, et al. (1998). "Evolutionary inferences of novel simian T lymphotropic virus type 1 from wild-caught chacma (Papio ursinus) and olive baboons (Papio anubis)." <u>Virology</u> **251**(1): 71-84.
- Mahieux, R., C. Pise-Masison, et al. (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**(13): 3762-3769.
- Mahieux, R., C. A. Pise-Masison, et al. (2000). "Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function." J Virol **74**(15): 6866-6874.
- Majorovits, E., M. Nejmeddine, et al. (2008). "Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography." PLoS One **3**(5): e2251.
- Makowska, Z. and M. H. Heim (2012). "Interferon signaling in the liver during hepatitis C virus infection." Cytokine **59**(3): 460-466.
- Mandal, P., B. E. Krueger, et al. (2011). "A gammaherpesvirus cooperates with interferonalpha/beta-induced IRF2 to halt viral replication, control reactivation, and minimize host lethality." <u>PLoS Pathog</u> 7(11): e1002371.

- Manel, N., B. Hogstad, et al. (2010). "A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells." <u>Nature</u> **467**(7312): 214-217.
- Manel, N., F. J. Kim, et al. (2003). "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV." Cell **115**(4): 449-459.
- Manns, A., W. J. Miley, et al. (1999). "Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection." J Infect Dis **180**(5): 1487-1493.
- Manns, A., R. J. Wilks, et al. (1992). "A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion." Int J Cancer **51**(6): 886-891.
- Mansky, L. M. (2000). "In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy." <u>J Virol</u> **74**(20): 9525-9531.
- Marriott, S. J. and O. J. Semmes (2005). "Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response." Oncogene **24**(39): 5986-5995.
- Matsuoka, M. and P. L. Green (2009). "The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis." Retrovirology 6: 71.
- Matsuoka, M. and K. T. Jeang (2007). "Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation." <u>Nat Rev Cancer</u> 7(4): 270-280.
- Mazurov, D., A. Ilinskaya, et al. (2010). "Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors." PLoS Pathog 6(2): e1000788.
- Meertens, L., S. Chevalier, et al. (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(41): 43307-43320.
- Melamed, A., D. J. Laydon, et al. (2013). "Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection." <u>PLoS Pathog</u> **9**(3): e1003271.
- Melamed, A., A. D. Witkover, et al. (2014). "Clonality of HTLV-2 in Natural Infection." <u>PLoS Pathog</u> **10**(3): e1004006.
- Meylan, E., J. Curran, et al. (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." <u>Nature</u> **437**(7062): 1167-1172.
- Miyamoto, K., N. Tomita, et al. (1984). "Transformation of ATLA-negative leukocytes by blood components from anti-ATLA-positive donors in vitro." Int J Cancer **33**(6): 721-725.
- Moens, B., C. Pannecouque, et al. (2012). "Simultaneous RNA quantification of human and retroviral genomes reveals intact interferon signaling in HTLV-1-infected CD4+ T cell lines." <u>Virol J</u> **9**: 171.
- Mohamed, Y. M., N. Bangphoomi, et al. (2014). "Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)." <u>Arch Virol</u>.
- Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, et al. (1976). "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows." <u>Science</u> **193**(4257): 1007-1008.
- Moriuchi, H., H. Masuzaki, et al. (2013). "Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1." Pediatr Infect Dis J **32**(2): 175-177.
- Mortreux, F., A. S. Gabet, et al. (2003). "Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo." Leukemia **17**(1): 26-38.
- Munir, M. and M. Berg (2013). "The multiple faces of proteinkinase R in antiviral defense." Virulence **4**(1): 85-89.
- Murphy, E. L., J. Fridey, et al. (1997). "HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators." Neurology **48**(2): 315-320.
- Murphy, E. L., S. Glynn, et al. (1998). "Laboratory test differences associated with HTLV-I and HTLV-II infection. Retrovirus Epidemiology Donor Study Investigators." <u>J Acquir Immune</u> <u>Defic Syndr Hum Retrovirol</u> **17**(4): 332-338.
- Muto, V., E. Stellacci, et al. (2011). "Human papillomavirus type 16 E5 protein induces expression of beta interferon through interferon regulatory factor 1 in human keratinocytes." J Virol **85**(10): 5070-5080.
- Nakano, K. and T. Watanabe (2012). "HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle." <u>Front Microbiol</u> **3**: 330.
- Nasr, R., A. Rosenwald, et al. (2003). "Arsenic/interferon specifically reverses 2 distinct gene networks critical for the survival of HTLV-1-infected leukemic cells." <u>Blood</u> **101**(11): 4576-4582.
- Neel, J. V., R. J. Biggar, et al. (1994). "Virologic and genetic studies relate Amerind origins to the indigenous people of the Mongolia/Manchuria/southeastern Siberia region." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 91(22): 10737-10741.
- Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1

Vpu." Nature 451(7177): 425-430.

- Nejmeddine, M., V. S. Negi, et al. (2009). "HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse." <u>Blood</u> **114**(5): 1016-1025.
- Nie, Y., G. L. Hammond, et al. (2007). "Double-stranded RNA deaminase ADAR1 increases host susceptibility to virus infection." <u>J Virol</u> 81(2): 917-923.
- Ning, S., A. M. Hahn, et al. (2003). "Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit." J Virol **77**(17): 9359-9368.
- Odorizzi, P. M. and E. J. Wherry (2013). "Immunology. An interferon paradox." <u>Science</u> **340**(6129): 155-156.
- Oh, U., Y. Yamano, et al. (2005). "Interferon-beta1a therapy in human T-lymphotropic virus type Iassociated neurologic disease." Ann Neurol **57**(4): 526-534.
- Okonski, K. M. and C. E. Samuel (2013). "Stress granule formation induced by measles virus is protein kinase PKR dependent and impaired by RNA adenosine deaminase ADAR1." J Virol 87(2): 756-766.
- Oliere, S., E. Hernandez, et al. (2010). "HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)." <u>PLoS Pathog</u> 6(11): e1001177.
- Oliveira, A. L., H. Hayakawa, et al. (2009). "High frequencies of functionally competent circulating Tax-specific CD8+ T cells in human T lymphotropic virus type 2 infection." J Immunol **183**(5): 2957-2965.
- Orland, J. R., J. Engstrom, et al. (2003). "Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study." <u>Neurology</u> **61**(11): 1588-1594.
- Osame, M., K. Usuku, et al. (1986). "HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity." <u>Lancet</u> **1**(8488): 1031-1032.
- Pais-Correia, A. M., M. Sachse, et al. (2010). "Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses." <u>Nat Med</u> **16**(1): 83-89.
- Paulus, C., S. Krauss, et al. (2006). "A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(10): 3840-3845.
- Perrillo, R. (2009). "Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B." <u>Hepatology</u> **49**(5 Suppl): S103-111.
- Pertel, T., S. Hausmann, et al. (2011). "TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice." Nature **472**(7343): 361-365.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev 202: 8-32.
- Peters, A. A., J. J. Oger, et al. (1999). "An apparent case of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II)-associated neurological disease: a clinical, molecular, and phylogenetic characterisation." J Clin Virol **14**(1): 37-50.
- Pfaller, C. K., Z. Li, et al. (2011). "Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response." <u>Curr Opin Immunol</u> **23**(5): 573-582.
- Philippe, N., M. Legendre, et al. (2013). "Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes." <u>Science</u> 341(6143): 281-286.
   Phuphuakrat, A., R. Kraiwong, et al. (2008). "Double-stranded RNA adenosine deaminases
- Phuphuakrat, A., R. Kraiwong, et al. (2008). "Double-stranded RNA adenosine deaminases enhance expression of human immunodeficiency virus type 1 proteins." <u>J Virol</u> 82(21): 10864-10872.
- Pindel, A. and A. Sadler (2011). "The role of protein kinase R in the interferon response." J Interferon Cytokine Res **31**(1): 59-70.
- Pique, C. and K. S. Jones (2012). "Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1." <u>Front Microbiol</u> 3: 378.
- Pise-Masison, C. A., M. Radonovich, et al. (2002). "Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes." <u>Cancer Res</u> 62(12): 3562-3571.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." <u>Nat Rev</u> <u>Immunol</u> **5**(5): 375-386.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, et al. (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **77**(12): 7415-7419.
- Popovic, M., M. S. Reitz, Jr., et al. (1982). "The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group." <u>Nature</u> **300**(5887): 63-66.

- Popovic, M., M. G. Sarngadharan, et al. (1984). "Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS." <u>Science</u> **224**(4648): 497-500.
- Prescott Lancing M., e. a. (2003). "Microbiologie."
- Quan, T. E., R. M. Roman, et al. (2010). "Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells." <u>Arthritis Rheum</u> **62**(6): 1693-1701.
- Ren, T. and H. Cheng (2013). "Differential transforming activity of the retroviral Tax oncoproteins in human T lymphocytes." Front Microbiol **4**: 287.
- Ren, T., W. Dong, et al. (2012). "HTLV-2 Tax immortalizes human CD4+ memory T lymphocytes by oncogenic activation and dysregulation of autophagy." J Biol Chem 287(41): 34683-34693.
- Rende, F., I. Cavallari, et al. (2012). "Comparison of the Genetic Organization, Expression Strategies and Oncogenic Potential of HTLV-1 and HTLV-2." <u>Leuk Res Treatment</u> 2012: 876153.
- Rice, G. I., P. R. Kasher, et al. (2012). "Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature." <u>Nat Genet</u> **44**(11): 1243-1248.
- Richardson, J. H., A. J. Edwards, et al. (1990). "In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1." J Virol **64**(11): 5682-5687.
- Romanelli, M. G., E. Diani, et al. (2013). "Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins." Front Microbiol **4**: 271.
- Romero, I. A., M. C. Prevost, et al. (2000). "Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system." <u>J Virol</u> 74(13): 6021-6030.
- Ross, T. M., S. M. Pettiford, et al. (1996). "The tax gene of human T-cell leukemia virus type 2 is essential for transformation of human T lymphocytes." J Virol **70**(8): 5194-5202.
- Rotger, M., K. K. Dang, et al. (2010). "Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals." PLoS Pathog **6**(2): e1000781.
- Roucoux, D. F. and E. L. Murphy (2004). "The epidemiology and disease outcomes of human Tlymphotropic virus type II." <u>AIDS Rev</u> 6(3): 144-154.
- Rowan, A. G. and C. R. Bangham (2012). "Is There a Role for HTLV-1-Specific CTL in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma?" Leuk Res Treatment **2012**: 391953.
- Ruscetti, F. W., D. A. Morgan, et al. (1977). "Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro." J Immunol **119**(1): 131-138.
- Saito, M., M. Nakagawa, et al. (2004). "Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." J Infect Dis **189**(1): 29-40.
- Sampey, G. C., R. Van Duyne, et al. (2012). "Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections." Front Genet 3: 295.
- Samuel, C. E. (2011). "Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral." <u>Virology</u> **411**(2): 180-193.
- Sathish, N. and Y. Yuan (2011). "Evasion and subversion of interferon-mediated antiviral immunity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: an overview." J Virol **85**(21): 10934-10944.
- Satou, Y., J. Yasunaga, et al. (2006). "HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(3): 720-725.
- Satou, Y., J. Yasunaga, et al. (2011). "HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo." <u>PLoS Pathog</u> **7**(2): e1001274.
- Schoggins, J. W. and C. M. Rice (2011). "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions." <u>Curr Opin Virol</u> 1(6): 519-525.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, et al. (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." Nature **472**(7344): 481-485.
- Seiki, M., S. Hattori, et al. (1983). "Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 80(12): 3618-3622.
- Semmes, O. J., F. Majone, et al. (1996). "HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs." <u>Virology</u> **217**(1): 373-379.
- Shah, K. M., S. E. Stewart, et al. (2009). "The EBV-encoded latent membrane proteins, LMP2A and LMP2B, limit the actions of interferon by targeting interferon receptors for degradation." <u>Oncogene</u> 28(44): 3903-3914.
- Sharp, P. M. (2002). "Origins of human virus diversity." Cell 108(3): 305-312.

Shimotohno, K., Y. Takahashi, et al. (1985). "Complete nucleotide sequence of an infectious clone
of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene." Proc Natl Acad Sci U S A 82(10): 3101-3105.

- 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(3): 428-437.
- Simmonds, P. (2001). "Reconstructing the origins of human hepatitis viruses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356(1411): 1013-1026.
- Slattery, J. P., G. Franchini, et al. (1999). "Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses." Genome Res 9(6): 525-540.
- Smith, D., G. J. Buckle, et al. (1999). "HTLV-I-infected T cells evade the antiproliferative action of IFN-beta." Virology 257(2): 314-321.
- Solis, M., P. Nakhaei, et al. (2011). "RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I." J Virol 85(3): 1224-1236.
- Soumelis, V., I. Scott, et al. (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." Blood 98(4): 906-912.
- Su, A. I., J. P. Pezacki, et al. (2002). "Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A 99(24): 15669-15674.
- Su, Q., S. Wang, et al. (2007). "Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2." EMBO Rep 8(3): 265-270.
- Sun, L., J. Wu, et al. (2013). "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway." Science 339(6121): 786-791.
- Suspene, R., V. Petit, et al. (2011). "Double-stranded RNA adenosine deaminase ADAR-1-induced hypermutated genomes among inactivated seasonal influenza and live attenuated measles virus vaccines." J Virol 85(5): 2458-2462.
- Suzuki, S., Y. Zhou, et al. (2010). "Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways." J Biol Chem 285(7): 4441-4446.
- Takahashi, K., S. Asabe, et al. (2010). "Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virusinfected cells, produce interferon, and inhibit infection." Proc Natl Acad Sci U S A 107(16): 7431-7436.
- Tattermusch, S., J. A. Skinner, et al. (2012). "Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy." PLoS Pathog 8(1): e1002480.
- Taubenberger, J. K. and J. C. Kash (2010). "Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation." Cell Host Microbe 7(6): 440-451.
- Taylor, G. P. and M. Matsuoka (2005). "Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy." Oncogene 24(39): 6047-6057.
- Terenzi, F., P. Saikia, et al. (2008). "Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1." <u>EMBO J</u> **27**(24): 3311-3321. Thoulouze, M. I. and A. Alcover (2011). "Can viruses form biofilms?" <u>Trends Microbiol</u> **19**(6): 257-
- 262.
- Toth, A. M., Z. Li, et al. (2009). "RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 suppresses measles virus-induced apoptosis and activation of protein kinase PKR." J Biol Chem 284(43): 29350-29356.
- Tough, D. F. (2012). "Modulation of T-cell function by type I interferon." Immunol Cell Biol 90(5): 492-497.
- Toulza, F., K. Nosaka, et al. (2009). "FoxP3+ regulatory T cells are distinct from leukemia cells in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia." Int J Cancer 125(10): 2375-2382.
- Uchiyama, T., J. Yodoi, et al. (1977). "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases." Blood 50(3): 481-492.
- Uze, G. and D. Monneron (2007). "IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family." Biochimie 89(6-7): 729-734.
- Van Brussel, M., M. Salemi, et al. (1998). "The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from Pan paniscus is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization." Virology **243**(2): 366-379.
- Van Damme, N., D. Goff, et al. (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." Cell Host Microbe 3(4): 245-252.
- Van Prooyen, N., H. Gold, et al. (2010). "Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases

cellular conduits and virus transmission." Proc Natl Acad Sci U S A 107(48): 20738-20743.

Vandamme, A. M., U. Bertazzoni, et al. (2000). "Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II." <u>Gene</u> **261**(1): 171-180.

- Vandamme, A. M., M. Salemi, et al. (1998). "The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I." <u>Trends Microbiol</u> **6**(12): 477-483.
- Vandamme, A. M., M. Salemi, et al. (1998). "African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies." J Virol 72(5): 4327-4340.
- Vandevenne, P., C. Sadzot-Delvaux, et al. (2010). "Innate immune response and viral interference strategies developed by human herpesviruses." <u>Biochem Pharmacol</u> **80**(12): 1955-1972.
- Verdonck, K., E. Gonzalez, et al. (2007). "Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection." Lancet Infect Dis **7**(4): 266-281.
- Viswanathan, K., M. S. Smith, et al. (2011). "BST2/Tetherin enhances entry of human cytomegalovirus." PLoS Pathog 7(11): e1002332.
- Wang, B. X. and E. N. Fish (2012). "The yin and yang of viruses and interferons." <u>Trends Immunol</u> **33**(4): 190-197.
- Ward, S. V., C. X. George, et al. (2011). "RNA editing enzyme adenosine deaminase is a restriction factor for controlling measles virus replication that also is required for embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 331-336.
- Watanabe, T., M. Seiki, et al. (1986). "Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV)." Virology **148**(2): 385-388.
- Wattel, E., J. P. Vartanian, et al. (1995). "Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type linfected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy." J Virol **69**(5): 2863-2868.
- Wieland, S., R. Thimme, et al. (2004). "Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(17): 6669-6674.
- Wilson, E. B. and D. G. Brooks (2013). "Interfering with type I interferon: a novel approach to purge persistent viral infection." <u>Cell Cycle</u> **12**(18): 2919-2920.
- Wolfe, N. D., W. Heneine, et al. (2005). "Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7994-7999.
- Woltman, A. M., M. L. Op den Brouw, et al. (2011). "Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function." <u>PLoS One</u> **6**(1): e15324.
- Wu, J., Z. Meng, et al. (2009). "Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells." <u>Hepatology</u> **49**(4): 1132-1140.
- Xie, L. and P. L. Green (2005). "Envelope is a major viral determinant of the distinct in vitro cellular transformation tropism of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2." J <u>Virol</u> **79**(23): 14536-14545.
- Xu, Y., Y. Hu, et al. (2009). "HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells." <u>Mol Immunol</u> **46**(13): 2640-2646.
- XuFeng, R., M. J. Boyer, et al. (2009). "ADAR1 is required for hematopoietic progenitor cell survival via RNA editing." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(42): 17763-17768.
- Yamada, Y., M. Tomonaga, et al. (2001). "A new G-CSF-supported combination chemotherapy, LSG15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study 9303." Br J Haematol **113**(2): 375-382.
- Yamagishi, M., K. Nakano, et al. (2012). "Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIKdependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers." <u>Cancer Cell</u> 21(1): 121-135.
- Yamagishi, M. and T. Watanabe (2012). "Molecular hallmarks of adult T cell leukemia." <u>Front</u> <u>Microbiol</u> **3**: 334.
- Yamano, Y. and T. Sato (2012). "Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." <u>Front Microbiol</u> **3**: 389.
- Ye, J., L. Xie, et al. (2003). "Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2." <u>J Virol</u> 77(14): 7728-7735.
- Yin, H., P. Kannian, et al. (2012). "Human T-cell leukemia virus type 2 antisense viral protein 2 is dispensable for in vitro immortalization but functions to repress early virus replication in vivo." J Virol 86(16): 8412-8421.
- Yoshida, M., I. Miyoshi, et al. (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**(6): 2031-2035.

- Young, H. A. and J. H. Bream (2007). "IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications." <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **316**: 97-117.
- Zhang, L. and J. S. Pagano (1997). "IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency." Mol Cell Biol **17**(10): 5748-5757.
- Zhang, J., O. Yamada, et al. (2008). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferonalpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300." <u>Virology</u> **379**(2): 306-313.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." <u>Nat Rev Cancer</u> **2**(5): 342-350.

# ANNEXES

# Annexe 1

# Gem-Induced Cytoskeleton Remodeling Increases Cellular Migration of HTLV-1-Infected Cells, Formation of Infected-to-Target T-Cell Conjugates and Viral Transmission.

Sébastien A. Chevalier, Jocelyn Turpin, Anne Cachat, Philippe V. Afonso, Antoine Gessain, John N. Brady, Cynthia A. Pise-Masison, Renaud Mahieux

PLoS Pathog. 2014 Feb 27;10(2):e1003917.

# Annexe 2

# Mice are not Men and yet... how humanized mice inform us about human infectious diseases

Anne Cachat, Julien Villaudy, Dominique Rigal, Louis Gazzolo, Madeleine Duc Dodon

Med Sci (Paris). 2012 Jan;28(1):63-8.

# Gem-Induced Cytoskeleton Remodeling Increases Cellular Migration of HTLV-1-Infected Cells, Formation of Infected-to-Target T-Cell Conjugates and Viral Transmission

Sébastien A. Chevalier<sup>1</sup>, Jocelyn Turpin<sup>1</sup>, Anne Cachat<sup>1</sup>, Philippe V. Afonso<sup>2</sup>, Antoine Gessain<sup>2</sup>, John N. Brady<sup>3+</sup>, Cynthia A. Pise-Masison<sup>4</sup>, Renaud Mahieux<sup>1\*</sup>

1 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, France, 2 Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, CNRS UMR 3569, Pasteur Institute, Paris, France, 3 Virus Tumor Biology Section, Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, 4 Animal Models and Retroviral Vaccine Section, Vaccine Branch, CCR, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America

#### Abstract

Efficient HTLV-1 viral transmission occurs through cell-to-cell contacts. The Tax viral transcriptional activator protein facilitates this process. Using a comparative transcriptomic analysis, we recently identified a series of genes up-regulated in HTLV-1 Tax expressing T-lymphocytes. We focused our attention towards genes that are important for cytoskeleton dynamic and thus may possibly modulate cell-to-cell contacts. We first demonstrate that Gem, a member of the small GTP-binding proteins within the Ras superfamily, is expressed both at the RNA and protein levels in Tax-expressing cells and in HTLV-1-infected cell lines. Using a series of ChIP assays, we show that Tax recruits CREB and CREB Binding Protein (CBP) onto a c-AMP Responsive Element (CRE) present in the *gem* promoter. This CRE sequence is required to drive Tax-activated *gem* transcription. Since Gem is involved in cytoskeleton remodeling, we investigated its role in infected cells motility. We show that Gem co-localizes with F-actin and is involved both in T-cell spontaneous cell migration as well as chemotaxis in the presence of SDF-1/CXCL12. Importantly, *gem* knock-down in HTLV-1-infected cells decreases cell migration and conjugate formation. Finally, we demonstrate that Gem plays an important role in cell-to-cell viral transmission.

Citation: Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, Afonso PV, Gessain A, et al. (2014) Gem-Induced Cytoskeleton Remodeling Increases Cellular Migration of HTLV-1-Infected Cells, Formation of Infected-to-Target T-Cell Conjugates and Viral Transmission. PLoS Pathog 10(2): e1003917. doi:10.1371/journal.ppat.1003917

Editor: Susan R. Ross, University of Pennsylvania School of Medicine, United States of America

Received July 8, 2013; Accepted December 20, 2013; Published February 27, 2014

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

**Funding:** RM and AC are supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. SAC was supported by Fondation pour la Recherche Médicale and InCa (Cancéropôle CLARA). JT was supported by FONDATION ARC. The authors acknowledge the support of Association de Recherche sur le Cancer and of La Ligue Contre le Cancer (équipe Labellisée). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: renaud.mahieux@ens-lyon.fr

† Deceased.

#### Introduction

Five to 10 million people are infected with the HTLV-1 retrovirus (Human T-cell Leukemia Virus Type 1) worldwide [1]; and 1–6% of infected people will develop either Adult T-cell Leukemia (ATL) [2], a malignant lymphoproliferation of mature activated T-cells, or inflammatory disorders, such as Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (TSP/HAM) [3,4].

The long period of clinical latency between primo-infection and ATL outcome suggests that the pathogenesis is a complex multistep process [5]. The exact mechanism by which infected individuals develop ATL is still debated, although the Tax viral oncoprotein has clearly been associated with cell transformation. Indeed, Tax not only activates viral expression but it also triggers a wide range of cell-signaling pathways, reprograms cell cycle, interferes with control checkpoints and inhibits DNA repair [6,7].

Tax immortalizes/transforms T-lymphocytes *in vivo* and *in vitro* [8] and promotes tumors in transgenic mice [9].

In contrast to HIV-1, HTLV-1-infected cells produce few free viral particles [10]. Therefore, efficient transmission of HTLV-1 from infected to uninfected T-cells relies on cell-to-cell contacts, both *in vitro* and likely *in vivo* [7,11]. Transmission of HTLV-1 particles to an uninfected T-lymphocyte occurs through two mutually non-exclusive models: (i) formation of a virological synapse between an infected lymphocyte and an un-infected lymphocyte (involving cytoskeleton reorganization and reorientation of the microtubule-organizing center (MTOC) in the infected T-lymphocyte) [12] or (ii) formation and transfer of a viral biofilm-like structure [13]. In the first situation, Tax promotes MTOC polarization and is found at the cell-to-cell junction and around the MTOC, together with the viral gag p19 protein [14,15], while viral particles might be transferred within the synaptic cleft [16]. In the biofilm model, HTLV-1 particles

#### **Author Summary**

HTLV-1 was the first human oncoretrovirus to be discovered. Five to ten million people are infected, and 1-6% will develop either Adult T-cell Leukemia, or Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (TSP/HAM). HTLV-1 infects primarily T-cells, but dendritic cells were also found to carry proviruses. Contrary to HIV-1, cell-free HTLV-1 viral particles are poorly infectious. Thus, efficient viral transmission relies on formation of virological synapses or formation and transfer of viral biofilm-like structures. The Tax viral transactivator plays a key role in both modes of transmission. Using transcriptomic analyses, we recently identified cellular genes that are deregulated following Tax expression in T-cells. We focused our attention on genes that are important for cell architecture and are thus likely to modulate cell-tocell contacts and motility. We found that Gem was highly upregulated both at the RNA and protein levels in Taxexpressing cells and HTLV-1-infected cell lines. We further show that Tax binds cellular co-activators and transcription factor and activates transcription from the gem promoter. We demonstrated that Gem is involved in cellular migration of HTLV-1-infected cells. Importantly, gem knockdown decreases the rate of HTLV-1-infected cell migration and cell-to-cell conjugate formation. We also show that Gem plays an important role in HTLV-1 transmission through cell-to-cell contacts, the most efficient mode of viral infection.

are stored and attached together on the outer cell surface in a virus-induced extracellular matrix composed of collagen, agrin and cellular linker proteins (tetherin and galactin3). During cell-to-cell contacts, these embedded extracellular virions spread and infect target cells. Tax plays also an important role by increasing the production of collagen, a component of this matrix [13]. Whether other cellular genes are targeted by Tax and enhance cell-to-cell transfer is currently a matter of investigation.

Using GeneChip Affymetrix technology, we recently identified a series of genes up-regulated in T-lymphocytes transduced by Tax-expressing lentivirus [17]. Among these genes, we focused our attention towards those that are important for cytoskeleton dynamic and thus possibly modulate cell-to-cell contacts. Gem, a member of the small GTP-binding proteins within the Ras superfamily [18], was found to be up-regulated following Tax expression [17]. Gem, together with Rad, Rem, and Rem2, form a subfamily of atypical proteins of the Ras family, often termed RGK (for Rad and Kir/Gem). Indeed, these proteins present significant variations, compared with other Ras family proteins in the regions involved in binding phosphate moieties of guanine nucleotides. The conserved threonine residue (T35) of the switch 1 region (often referred to as the effector region) that coordinates magnesium ion complexing the beta and gamma phosphates of GTP (Mg-GDP/GTP binding) is absent, and the DXXG region of switch 2 which contributes to nucleotide binding and GTPase catalysis is profoundly modified to DXWE. As a consequence, Gem markedly prefers GDP over GTP, and more importantly, Gem has an undetectable intrinsic GTPase activity [18-20].

Activation or deregulation of Ras signaling pathways causes cell growth, differentiation and survival and can ultimately lead to oncogenesis and cancer [21]. Gem expression is induced in human peripheral blood T-cells by mitogens such as PHA or PMA [22] and promotes cell shape remodeling by restructuring actin cytoskeleton and microtubule networks. In epithelial cells, Gem induces cell elongation, with disappearance of actin stress fibers, loss of focal adhesion and enhancement of the actin cortical network [23]. Using a library of randomized hybrid ribozymes, Gem was identified as an actor in cell invasiveness, a process that is essential for tumor metastasis [24]. In neuroblastoma cells, Gem antagonizes Rho kinase-induced neurite retraction and morphological differentiation [18]. Therefore, we hypothesize that Gem could play an essential role in HTLV-1 transmission.

We demonstrated here that Gem is highly expressed at the RNA and protein levels in Tax-expressing cells and HTLV-1infected cell lines. We further delineated the mechanism of Taxinduced *gem* transactivation and show that Tax recruits CREB and the CBP co-activator onto a CRE sequence present on the *gem* promoter. Gem protein co-localizes with F-actin and is involved in spontaneous cell migration and chemotaxis. Importantly, we observed that *gem* knock-down decreases the rate of HTLV-1infected cell migration and conjugate formation. Most importantly, we demonstrated that Gem expression in HTLV-1-infected cells is involved in viral transmission, from infected cells to target cells through enhanced cell-to-cell contacts.

#### Results

# *Gem mRNA* and Gem protein levels are up-regulated in Tax-expressing and HTLV-1-infected cells

Using transcriptional profiles analyses, we recently identified genes that are up-regulated in T-lymphocytes transduced by Tax lentivirus [17]. In order to identify genes that could play a role in cell transmission, we focused our retrospective analysis on genes that are involved in cytoskeleton remodeling. Interestingly, *gem* mRNA was strongly up-regulated (28 fold) in Tax expressing vs. control cells. We also performed a database search on HTLV gene expression profiles and uncovered that *gem* up-regulation was also listed in previous studies that used high-throughput approaches on Tax expressing lymphocytes, HTLV-1-infected cells lines or HTLV-1 immortalized cells [25–27] (Table S1). These observations led us to investigate in more details the mechanisms and biological consequences of Tax-induced *gem* transactivation.

We first confirmed the microarray analyses by performing RT-PCR experiments and demonstrated that *gem* expression is strongly up-regulated in 293T cells transduced with Tax lentiviral particles but not in cells transduced with a control lentivirus (Figure 1A lane 2 vs. 3). Gem protein was also strongly overexpressed in 293T and MOLT4 cells transduced with Tax-expressing lentivirus, while it was undetectable in the absence of Tax expression (Figure 1B and 1C). As controls, Tax and GAPDH protein levels were evaluated by western blot.

We also used the Tax inducible JPX-9 T-cell line to confirm the effect of Tax on Gem expression (Figure 1D). Tax expression was induced by addition of ZnCl<sub>2</sub> in the culture media for 24 h or 48 h. Interestingly, in that lymphocytic cell line, Gem expression also follows Tax induction. We then assessed Gem expression in a series of HTLV-1-infected cell lines (C8166, C91/PL, Hut102 and MT2). All cell lines tested showed a high level of Gem protein expression, while in non-infected T-lymphocytes (CEM, Jurkat and MOLT4) Gem expression was not detectable (Figure 1E). As controls, Tax and GAPDH protein levels were evaluated by western blot. Altogether, these results demonstrate that Tax expression is sufficient to induce Gem expression both at RNA and protein levels in different cell types.



**Figure 1. Gem is overexpressed in T- and non-T-Tax-expressing cells as well as in HTLV-1 infected cells.** (A): Total RNA was extracted from 293T cells transduced with Lenti-control (lane 2) or Lenti-Tax (lane 3) and RT-PCR was performed using *gem* or *GADPH* specific primers. Lane 1 is a control of extraction. (B, C): Western blot analyses were performed with 70 µg of proteins from (B) 293T or (C) MOLT4 cells transduced by Lenti-control or Lenti-Tax vectors (72 h post-transduction). (D): JPX-9 cells were grown for 24 h or 48 h in the presence of ZnCl<sub>2</sub> (120 µM). Western blot analyses were performed with 70 µg of cellular extracts. (E): Western blot analyses were performed with 70 µg of cellular extracts obtained from non-infected (CEM, Jurkat and MOLT4) or HTLV-1-infected (C8166, C91/PL, Hut102 and MT2) T-lymphocytes. (B, C, D, E): Membranes were probed with anti-Gem (1:2,000) and anti-GAPDH (1:1,000) or anti-Tax Tab 172 (1:500) antibodies.

#### Tax recruits CREB and CBP onto the Gem promoter

The sequence of *gem* promoter contains a cAMP Responsive Element (CRE) [28]. This sequence is very similar to the Tax Responsive Elements (TRE) present in the U3 region of the 5' viral Long Terminal Repeat (Figure 2A).

To determine whether the CRE sequence in the *gem* promoter is required for Tax-mediated transactivation, we compared transactivation levels of reporter plasmids encompassing either the fulllength *gem* promoter (Gem-luc) or the CRE-deleted promoter ( $\Delta$ CRE-Gem-luc) (Figure 2A). Reporter plasmids were transfected in 293T cells previously transduced with lentiviral particles allowing Tax expression. In contrast to the control vector, Tax significantly activated transcription from the wild-type *gem* promoter (p = 4.10<sup>-4</sup>, ANOVA and Tukey post-hoc test), but not from the  $\Delta$ CRE promoter, thus indicating that the CRE sequence is indeed necessary for Tax-mediated transactivation (Figure 2B).

It is well established that Tax activates the viral promoter (5'LTR) through its ability to bind CREB and its co-activators CREB Binding Protein (CBP) and p300 [29]. To determine whether Tax activates transcription from the *gem* promoter through a similar mechanism, we performed Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) using extracts from C8166 cells (Tax-expressing cells). This allowed us to demonstrate that Tax, CREB and CBP were present on the *gem* promoter (Figure 2C lanes 3, 4 and 5). The HTLV-1 LTR (lower panel) was used as control for complex binding.

These results indicate that *gem* transcription results from a direct interaction between Tax, CREB and CBP on the CRE sequence present in the *gem* promoter.

# Gem colocalizes with actin but not with Tax and promotes changes in cell morphology

Gem was previously reported to be involved in cell cytoskeleton remodeling [23]. To determine whether Gem colocalizes with Factin, a Gem-expressing vector was transfected and immunofluorescence experiments were performed in different cell types (Figures 3, Figure 4 and Figure 5). Gem promoted cell elongation, with a disappearance of actin stress fibers and a loss of focal adhesion points (Figure 3A), which were still present in cells transfected with backbone vector (Figure 3B, see actin stress fiber (white arrows) and focal adhesion points (yellow arrows)). Importantly, Gem colocalized with cortical actin filaments in non-T and in T cells (Figure 3A, Figure 4 and Figure 5). Gemexpressing cells presented various shapes and lengths with very long extensions as well as membrane protrusions (Figure 4). As previously described for N1E-115 mouse neuroblastoma cells and NIH3T3 cells [30], Gem expression induced unusual dendritic morphology with (Figure 4, right panel "4") or without (left panel "1") a large "synaptic bouton" morphology. Flattened bipolar ("2") or multipolar ("3") cells, notably described as an intermediate phenotype in N1E-115 cells expressing a mutated MLC (18D, 19D) were also observed.

Due to its role in cytoskeleton reorganization and reorientation of the MTOC during the formation of the virological synapse [12,14,15], we hypothesized that Tax could also colocalize with Gem in the actin-rich membrane protrusions. A Flag-Tax plasmid was transfected together with a HA-Gem plasmid and immunofluorescence experiments were performed. Tax and Gem colocalization could not be observed (Figure 5B). Even at high magnification (Figure 5B), Tax cytoplasmic speckles (visible in green) did not merge with Gem signal (visible in red). This result was also confirmed by co-immunoprecipitation experiments, which did not demonstrate any interaction between Tax and Gem (data not shown).

#### Gem is directly implicated in the migration of HTLV-1infected cells

Cell mobility follows a perpetual reorganization of the actin cytoskeleton, where monomers of actin polymerize to form fibers [31]. A previous report demonstrated that HTLV-1-infected Tlymphocytes have increased mobility [32], which could be beneficial for cell-to-cell viral transmission by increasing the probability of encountering uninfected target cells. Moreover, HTLV-1-infected T-lymphocytes induce blood brain barrier (BBB) disruption. This allows infected cells to enter into the central nervous system (CNS) [33]. Because Gem promotes reorganization of the cytoskeleton, we hypothesized that it could play a role in the observed enhanced cell motility of HTLV-1infected cells.

We therefore performed a series of Transwell migration assays. The ability of cells to transfer from the upper chamber to the lower chamber of a Transwell permeable filter was measured and the percentage of migrating cells was then quantified by flow cytometry. We first observed that C91/PL and Hut102 (HTLV-1-infected cell lines) had a higher mobility than non-infected MOLT4 T-cells (Figure 6A, p<0.001, ANOVA and Dunnet posthoc test). Interestingly, the ability of HTLV-1 cells to migrate seemed to correlate with Gem expression levels (Figure 6B), suggesting that HTLV-1-induced migration increase was associated with Tax-induced Gem overexpression.

To test this hypothesis, Gem siRNA or control siRNA were transfected into C91/PL cells. As expected, Gem expression dramatically decreased in Gem siRNA transfected cells but not in cells transfected with irrelevant siRNA (Figure 7A, lanes 6–8 vs. 2–4). As controls, Tax and actin western blots were performed and did not show any significant change (Figure 7A lower panels).

Using Transwell migration assays, we then measured the spontaneous migration of C91/PL after transfection of Gem siRNA or control siRNA (Figure 7B). A 33% decrease in migration was observed in C91/PL transfected with Gem siRNA (Figure 7C, p = 0.018, Student's t-test). As a control, Gem western blot was performed using cell extracts from cells transfected with control or Gem siRNA (Figure 7D). Altogether, these results demonstrate that Gem plays an essential role in the enhanced cellular migration of HTLV-1-infected cells.

#### Gem expression increases cellular migration

To test whether Gem is sufficient to increase cell motility, we then performed a wound-healing assay (Figure 8). Seventy-two hours post-transduction with control or Gem lentiviral particles, Hela cell monolayers were wounded and a first image was taken (time = 0 h). Of note, the presence of an IRES-GFP in the lentiviral vectors allows the monitoring of transduced (ie. GFPpositive cells) cells. Pictures were then taken after 3 h, 6 h, 9 h and 12 h, and distance between the 2 fronts of migration was measured (Figure 8A–B). Interestingly, after 12 h, Gem-expressing cells migrated 33% faster than cells transduced with the control lentiviral particles (Figure 8B). Of note, 100% healing would mean that the wound is totally closed. The difference between control and Gem expressing cells was visible at each time point (Figure 8B). As a control, Gem expression was determined by western blot (Figure 8C). These results demonstrate that Gem expression is sufficient to increase Hela cells spontaneous migration.

Since T-cells are the primary targets of HTLV infection *in vivo*, we then assessed the role of Gem in chemokinesis (spontaneous cellular migration) and in chemotaxis (in presence



**Figure 2. Together with CREB and CBP, Tax is present on the Gem promoter and activates its transcription.** (A): Schematic representation of the c-AMP Responsive Element (CRE) and Tax Responsive Element (TRE) sequences present in the *gem* promoter and in the HTLV-1 viral promoter, respectively. The core CRE sequence is underlined and in bold.  $\Delta$ CRE corresponds to deletion of the 4 central nucleotides of the core CRE sequence (B): 293T cells were transduced with Lenti-control or Lenti-Tax particles. Forty-eight hours later, transduced cells were transfected with 500 ng of Gem-luc or  $\Delta$ -CRE-Gem-luc reporter plasmids, 10 ng of phRG-TK (Promega), and DNA amount was adjusted with backbone vector. Transfection results were normalized to Renilla activity. The results represent the average of at least 3 independent experiments. \*\*: significantly different,  $p = 4.10^{-4}$ , ANOVA and Tukey post-hoc test, ns = non significant (C): Chromatin immunoprecipitation experiments were performed with C8166 (HTLV-1-infected) cells. ChIP assay was carried out using 10  $\mu$ g of Tax (Tab 172), CREB or CBP antibody as previously described [44,45]. PCR was performed using primers specific for the HTLV-1 LTR or *gem* promoter. doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g002



**Figure 3. Gem expression induces actin re-localization.** (A, B): HeLa cells were transfected with 400 ng of (A): HA-Gem, (B): backbone vector. (A, B): Twenty-four hours later, cells were fixed and stained with anti-HA antibody, followed by anti-rabbit-IgG FITC-conjugated antibody. Actin was stained with Rhodamine-Phalloïdin toxin (R415 300U, Life Technologies). Nucleic acids were stained with DAPI-containing mounting medium (DAPI Fluormount G, Southern biotech). Cells were visualized and acquired with a spectral Leica SP5 confocal microscope. (B): White and yellow arrows represent actin stress fibers and focal adhesion points, respectively. (A): Two-dimensional graph representing pixel intensities (gray level) along a 15 micrometers line (see yellow line on the merged image) was plotted. Green line displays HA-Gem signal intensity and red line displays actin signal intensity (1) 171 (jaure) repet 1002017 (2002)

doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g003



**Figure 4. Gem expression induces morphological changes.** HeLa cells were transfected with 400 ng of HA-Gem. Twenty-four hours later, cells were fixed and stained with anti-HA antibody, followed by anti-rabbit-IgG FITC-conjugated antibody. Actin was stained with Rhodamine-Phalloïdin toxin (R415 300U, Life Technologies). Nucleic acids were stained with DAPI-containing mounting medium (DAPI Fluormount G, Southern biotech). Cells were visualized and acquired with a spectral Leica SP5 confocal microscope. The percentage of each described phenotype ("1", "2" "3", "4") was counted manually. Two-dimensional graphs representing pixel intensities (gray level) along a 15 micrometers line (see yellow line on the merged image) were plotted. Green line displays HA-Gem signal intensity and red line displays actin signal intensity (Rhodamine-Phalloïdin). doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g004



**Figure 5. Gem colocalizes with actin but not with Tax.** (A): PBLs were electroporated with 5 µg of HA-Gem and forty-eight hours later cells were processed as in (B). (B): HeLa cells were transfected with 400 ng of HA-Gem, or (B): co-transfected with 400 ng of HA-Gem and 400 ng of Flag-Tax. DNA amount was adjusted with backbone vector. Twenty-four hours later, cells were fixed and stained with anti-HA or anti-Flag antibody, followed by anti-rabbit-IgG FITC-conjugated or anti-mouse-IgG CY3-conjugated antibody, respectively. Actin was stained with Rhodamine-Phalloidin toxin (R415 300U, Life Technologies). Nucleic acids were stained with DAPI-containing mounting medium (DAPI Fluormount G, Southern biotech). Cells were visualized and acquired with a spectral Leica SP5 confocal microscope. (A): Two-dimensional graphs representing pixel intensities (gray level) along a 10 micrometers line (see yellow line on the merged image) were plotted. Green line displays HA-Gem signal intensity and red line displays actin signal intensity (Rhodamine-Phalloïdin). doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g005



Figure 6. Gem expression level is correlated to cell migration. (A): Non-infected (MOLT4) or HTLV-1-infected (C91/PL and Hut102) Tlymphocytes ( $5 \times 10^5$ ) were loaded on a 5  $\mu$ m permeable Transwell filter. Twenty-four hours later, cell migration was quantified by flow cytometry (flow cytometer Facscalibur4c+HTS (BD biosciences)). (B): Western blot analyses were performed on 70  $\mu$ g of cellular extracts from non-infected (MOLT4) or HTLV-1-infected (C91/PL and Hut102) T-lymphocytes. Membranes were probed with anti-Gem (1:2,000) or anti- $\beta$ -actin (1:40,000) antibody (Sigma). \*\*: significantly different, p<0.001, ANOVA and Dunnet post-hoc test. doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g006



**Figure 7. Gem is involved in HTLV-1-infected cell migration.** (A): Western blot analyses were performed on 70  $\mu$ g of protein extracts from C91/PL (HTLV-1-infected) lymphocytes transfected either with 75 nM of Gem siRNA or control siRNA. Membranes were probed with anti-Gem (1:2,000), anti-Tax Tab 172 (1:500) or anti- $\beta$ -actin (1:40,000) antibody. (B): Schematic representation of the protocol used for the cellular migration assays. C91/PL cells were transfected either with 75 nM of Gem siRNA or control siRNA. Twenty-four hours post-transfection,  $5 \times 10^5$  cells were collected and loaded on a 5  $\mu$ m permeable Transwell filter. (C): Cell migration was quantified by flow cytometry. (D): Western blot analyses were probed with anti-Gem (1:2,000) or anti- $\beta$ -actin (1:40,000) antibody. \*: significantly different, p = 0.018, Student's t-test. doi:10.1371/journal.ppat.1003917.q007



**Figure 8. Gem expression is sufficient to increase cell motility.** (A): HeLa cells were transduced with Lenti-control or Lenti-Tax viral particles. When cells reached 100% confluence, a wound was made in the cell monolayer and pictures were taken at 0 h and up to 12 h post-wounding. Measurements between the 2 fronts of migration were performed using image-J software (NIH, USA). (B): Percentage of healing during a 12 h kinetic. (C): Western blot analyses were performed on 70 μg of cellular extracts transduced by Lenti-control or Lenti-Tax viral particles. Membranes were probed with anti-Gem (1:2,000) or anti-GAPDH (1:1,000) antibody. doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g008

of chemoattractant) after MOLT4 transduction with Gem or control lentiviral particles. The ability of cells to transfer from the upper chamber into the lower chamber of a Transwell permeable filter was measured in absence or presence of a chemoattactant (SDF1/CXCL12). Percentage of migrating cells was then quantified by flow cytometry (Figure 9A). We first assessed the localization of Gem in MOLT4 transduced cells and observed colocalization of Gem with cortical actin (Figure 9B). This result is consistent with results observed in Figures 3A, 4 and 5. An 8-fold increase in migration was observed in T-cells transduced with Gem lentiviral particles compared to controls (Figure 10A, p<0.0001, Student's t-test). In the presence of SDF1/CXCL12 (Figure 10C), 40% of Gem transduced MOLT4 cells migrated into the lower chamber, while only 15% of the MOLT4 cells transduced with the control lentiviral particles migrated (p < 0.0001, Student's t-test). As a control, Gem expression was monitored by western blot (Figure 10B and 10D). These experiments demonstrate that Gem expression is sufficient to increase T-cell chemokinesis and chemotaxis.

#### Gem is involved in conjugate formation

Efficient transmission of HTLV-1 from infected to uninfected T-cells relies on cell-to-cell contacts. Tax and p8 (cleavage product of p12) were previously shown to be involved in formation of cell-to-cell conjugates [14,34]. In order to determine whether Gem plays a role in this process, Hut102 (HTLV-1-infected) were transfected with Gem siRNA or control siRNA before culturing them with Jurkat target cells that have been labeled with dye (Figure 11A). A 40% reduction (p = 0.05, Mann-Whitney test) in the number of T-cell conjugates (Figure 11A, white arrows) was observed when Jurkat cells were incubated with Hut102 cells transfected with Gem siRNA (Figure 11B). Similar results were obtained with MT2 cells (data not shown). These results indicate that Gem is directly involved in the formation of T-cell conjugates and is, therefore, likely to play a role in viral transmission from infected cells to target cells.

# Gem is involved in viral transmission but not in viral production

Finally, to assess whether Gem could be involved in viral transmission, we performed a cell-to-cell viral transfer experiment. Hut102 cells were transfected with Gem siRNA or control siRNA. Forty-eight hours post transfection they were co-cultured for a short period of time (20 minutes) with Jurkat target cells that have been previously labeled with dye. We then monitored by flow cytometry the level of intracellular gag p19 in the Jurkat cells. p19 signal monitors viral transfer from infected cells toward target cells (Figure 11C). These results demonstrate that a reduction in Gem expression directly impacts viral transmission, decreasing the number of cells infected by 20% (p = 0,02, Student's t-test). This result is consistent with the 40% reduction in conjugate formation observed in figure 11B. As control, Gem and beta-tubulin levels were monitored by western blot analysis. Of note, a 22% decrease in Gem level expression was observed in cell transfected with Gem siRNA (Figure 11C lower panel).

To determine if the decrease in viral transfer impacted productive infection, we transfected C91/PL cells with control or Gem siRNA and a plasmid expressing GFP. Twenty-four hours after transfection, GFP positive cells were harvested by cell sorting of the transfected cultures. These cells were then co-cultured for one hour with a reporter cell line BHK1E6, containing the lacZ gene driven by the HTLV-1-LTR promoter. Cells transfected with control siRNA were capable of transmitting virus to target cells resulting in expression of  $\beta$ -galactosidase. In contrast, no  $\beta$ -galactosidase positive cells were measured when Gem protein expression was knocked down (Figure 11D, graph). As a control Gem expression was monitored by western-blot (Figure 11D, lower panel).

To be sure that the decrease in viral transmission was not due to a decrease in viral production and release following siRNA transfection, Gag p19 was monitored by ELISA (Zeptometrix Corporation) from 24 h to 72 h in the cell culture supernatant of HTLV-1 cells treated with Gem siRNA or control siRNA (Figure S1). We did not observe any significant difference in viral production in cells treated with Gem siRNA. This confirms that the decrease in viral transmission seen above is not due to a decrease in viral production but to the direct role of Gem in viral transfer.

Altogether, these results indicate that Gem is not only involved in the formation of T-cell conjugates but also in viral transmission from infected cells to target cells.

#### Discussion

In contrast to HIV-1, HTLV-1-infected cells produce few free viral particles [10]. Indeed, efficient transmission of the virus from an infected cell to an uninfected T-lymphocyte relies mostly on cell-to-cell contacts via the formation of a virological synapse and/ or of a viral biofilm-like structure [12–15]. In both models, Tax plays an important role. Thus, one can assume that blocking the formation of cell conjugates would have a major impact on cell transmission and proviral load evolution.

We previously identified a set of genes that are up-regulated in T-cells transduced by HTLV-1 Tax encoding lentivirus [17]. Here, we performed a retrospective analysis, focusing our attention on genes that could potentially be involved in HTLV viral transmission, and identified gem. Interestingly, data mining allowed us to retrieve previous reports which also listed gem mRNA among the genes that are up-regulated gene in Tax-transformed lymphocytes (Tesi), Tax-inducible JPX-9 cells, HTLV-1-transformed (C8166 and Hut102) or -immortalized cells (Bes, ACH.WT and Champ) [17,25-27]. Our results also demonstrate that Gem is strongly expressed at the protein level following Tax expression in T-lymphocytes and in all HTLV-1-infected cell lines tested. The fact that Gem expression is directly linked to Tax expression was confirmed by the reporter gene and Chip assays, demonstrating that together with CREB and CBP, Tax activates transcription from the gem promoter through a CRE sequence.

Small GTPases of the Rho family are pivotal regulators of several aspects of cell behavior, such as cell motility, cell proliferation and apoptosis. They play a central role in many motile responses that involve the actin cytoskeleton and/or microtubule network, from neurite extension to phagocytosis and cancer-cell invasion [35]. Our results show that Gem strongly colocalizes with F-actin and are consistent with its direct involvement in actin cytoskeleton dynamic. Polymerization of actin soluble units in filaments is a major mechanism for the cell movement [31]. Interestingly, Kress et al., showed that fascin, a protein that stabilizes filamentous actin and concentrates in cellular protrusions, such as filopodia, during cell migration, is overexpressed following Tax expression. This protein is overexpressed in HTLV-1-infected cell lines and involved in HTLV-1 cellular invasion [25]. Moreover, Varrin-doyer et al., also demonstrated that the collapsing response mediator protein 2 (CRMP2) was overexpressed in HTLV-1-infected T-lymphocytes in vitro, showed that CRMP2 was involved in migration of these cell clones and demonstrated that Tax was partly involved both in



**Figure 9. Gem expression is sufficient to increase chemokinesis and chemotaxis.** (A): Schematic representation of the protocol used for the cellular migration assay. (B): MOLT4 cells were transduced with control or Gem viral particles. Forty-eight hours later, cells were processed as described above. Two-dimensional graphs representing pixel intensities (gray level) along a 15 micrometers line (see yellow line on the merged image) were plotted. Cyan line displays HA-Gem signal intensity and red line displays F-actin signal intensity (phalloïdin-rhodamine). doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g009

modulation of CRMP2 level and lymphocyte migratory rate. In addition, CRMP2 remodels T-lymphocyte microtubule cytoskeleton and partially co-localized with Tax at the cell-to-cell contact point in HTLV-1-infected cells [32]. We did not observe such colocalization between Gem, Tax and actin within the cells. However, expression of Gem either directly or through Tax induction was sufficient to increase lymphocyte migratory rates, and Gem suppression in HTLV-1-infected cells severely reduced cellular migration. These results demonstrate a direct role of Gem in HTLV-1-infected lymphocytes migration and it would now be interesting to define whether their shape was also modified. Interestingly, it has been demonstrated that HIV-1 is also able to modify actin dynamics in order to promote HIV infection. In fact, Yoder et al., demonstrated recently that during HIV infection the actin cytoskeleton in resting T-cells is a post-entry barrier for HIV-1 [36,37]. However, the virus has developed a strategy to overcome this restriction. Binding of the gp120 envelope glycoprotein to the CXCR4 chemokine co-receptor induces activation of a cellular protein named cofilin. Cofilin is a critical factor for depolymerizing the cortical actin filaments (F-actin), therefore allowing migration of the viral material into the cell

Gem is a negative regulator of the ROCK-I (ROKB) Rho kinase. When overexpressed, Gem inhibits ROCK I-induced neurite retraction and ROCK-mediated phosphorylation of myosin light chain (MLC) and myosin light chain phosphatase (MLCP) [30]. Interestingly, CRMP2 is phosphorylated by another Rho kinase: ROCK-II (ROKa). CRMP2 normally promotes axon outgrowth, possibly through its ability to promote microtubule assembly. It has been shown that CRMP-2 phosphorylation is involved in the regulation of the neurons growth cone morphology [38]. Fascin is also a target of Rho-kinases. Rho activity modulates the interaction of Fascin with the p-Lin-11/Isl-1/Mec-3 kinase 1 and 2 (LIMK1/2), which allow the recruitment of this complex to actin filaments. This interaction modulates actin filopodia dynamics and promotes its stabilization [39]. Thus, CRMP2 and Fascin have been proposed to function down-stream of Rho kinases [35,39], whereas Gem is an upstream negative regulator of ROCK-I Rho kinase [30]. Altogether, these results suggest that Fascin, CRMP-2 and Gem are different actors that play a role in the regulation of HTLV-1-infected cell motility and are therefore involved in viral transmission. However, our results show that Gem could have additional functions during HTLV-1 infection. First, it is involved in the formation of conjugates between infected and uninfected T-lymphocytes. Of note, Tax and p8 were also previously shown to be involved in the formation of cell-to-cell conjugates that involve cytoskeleton reorganization [14,31]. In the HIV-1 situation, the virus is also transmitted through the production of free viral particles by the infected cells [40]. In contrast, HTLV-1 transmission occurs mainly through cell-to-cell contacts [11-13,16]. Thus, we hypothesize that the enhanced cell migration upon HTLV-1 infection increases the probability of encountering and infecting new target cells through the creation of cell-to-cell contacts.

Thus our results indicate that HTLV-1-infected cells, which express Gem, are likely to migrate faster and to form more conjugates with target T-cells and thus to transmit more efficiently the virus. It would now be of interest to assess simultaneously the relative contribution of Fascin, CRMP-2 and Gem in HTLV-1-infected cells motility and viral transmission.

In conclusion, our results demonstrate that HTLV-1 Tax protein promotes Gem expression *in vitro* and *in vivo*. As a consequence, Gem modifies cell morphology and increases migration of HTLV-1-infected cells as well as formation of cellto-cell conjugates.

Finally, we demonstrate that Gem plays an important role in cell-to-cell viral transmission.

#### **Materials and Methods**

#### Cell culture

293T, HeLa, Jurkat and MOLT4 cells were obtained from ATCC. HTLV-1-infected cell lines and JPX-9 cell line were obtained from Dr Antoine Gessain (Pasteur Institute, Paris). 293T and HeLa cells were cultured in DMEM-GLUTAMAX-I (Gibco, Invitrogen) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen) and antibiotics (penicillin-streptomycin, PAA). MOLT4, Jurkat, JPX-9 and HTLV-1-infected cell lines (C8166, C91/PL, Hut102 and MT2) were cultured in RPMI-GLUTA-MAX-I (Gibco, Invitrogen), complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen), and antibiotics (PAA). Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Tax expression was induced by adding 120  $\mu$ M of ZnCl<sub>2</sub> in the culture media of JPX-9 cells [41].

# Lentiviral particles production and transduction experiments

Production of Lenti-IRES-GFP (named "Lenti-control" thereafter), Lenti-Tax-IRES-GFP (named "Lenti-Tax" thereafter) and Lenti-HA-Gem-IRES-GFP (named "Lenti-Gem" thereafter) lentiviral particles as well as cell transduction procedures were performed as previously described [17]. Stocks of lentiviral particles were stored at  $-80^{\circ}$ C.

#### Plasmids

Gem cDNA was amplified from pMT2T-Gem vector [42] and cloned either in frame with a HA tag into the pSG5M vector [43] or into the pSDM101 vector [17]. Tax-1 cDNA was amplified from pSG5M-Tax-1 vector [43] and cloned in frame with a Flag tag into the pSG5M vector.

#### RT-PCR

Seventy-two hours post-transduction, total RNAs were extracted from 293T cells using the RNeasy mini kit (Qiagen). To avoid DNA carryover, RNA samples were treated with DNase I RNasefree DNAs set (Qiagen). Five hundred nanograms of total RNA were used as a matrix for RT-PCR using the one step RT-PCR kit (Qiagen). PCRs were performed with an annealing temperature of 52°C for Gem primers (Fwd: [5'-GAACTAGGCTCATCA-GAATCGTGAC-3']; Rev: [5'-GAGCTGTGACATACAAGG-GTCAACC-3']) or of 59°C for GAPDH primers ([17]).

#### Chromatin immunoprecipitations (Chip) assay

ChIP assay was carried out using 10  $\mu$ g of antibody to Tax (Tab 172, NIH), CREB or CBP (Santa Cruz biotechnologies) antibodies as described previously [44,45]. C8166 cells (5×10<sup>7</sup>)



**Figure 10. Gem expression is sufficient to increase chemokinesis and chemotaxis.** (A, C): MOLT4 cells were transduced with Lenti-control or Lenti-GEM. Forty-eight hours later,  $5.10^5$  cells were collected and loaded on a 5 µm permeable Transwell filter in absence or presence of SDF1/ CXCL12 (150 ng/ml). Twenty-four hours later, cell migration was quantified by flow cytometry (flow cytometer Facscalibur4c+HTS (BD biosciences)). (B, D): Western blot analyses were performed on 70 µg of cellular extracts from MOLT4 cells transduced by Lenti-control or Lenti-GEM viral particles. Membranes were probed with anti-Gem (1:2,000) or anti-GAPDH (1:1,000) antibody. \*\*\*: significantly different, p<0.0001, Student's t-test. doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g010

were cross-linked and sheared by sonication to get 200- to 800-bp DNA fragments. Chromatin extracts were pre-cleared with salmon sperm DNA and magnetic protein G beads (Sigma). Supernatants were diluted 10-fold with ChIP dilution buffer, and appropriate antibodies were added and incubated overnight at 4°C. Immune complexes were then collected by addition of magnetic protein-G beads and washed stepwise. Cross-linking was reversed and DNA was purified by proteinase K (Sigma) treatment, phenol extraction, and ethanol precipitation. PCR was performed using primers specific for the HTLV-1 LTR (nucleotides -160 to -139 [5'-CCACAGGCGGGAGGCGGCA-GAA-3'] and nucleotides -102 to -79 [5'-TCATAAGCTCA-GACCTCCGGGAAG-3']) or Gem promoter (nucleotides -759 to -738 [5'-GAGATGCTGCTGATTGGATGC-3'] and nucleotides -136 to -115 [5'-CCTCTGCAGCAAACTCG-GAGT-3']).

#### Immunoblot analysis

Lentivirus-transduced cells, HTLV-1-infected or siRNA-transfected cells were collected and washed with PBS. Proteins were extracted using WCE buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) in the presence of protease inhibitors (Complete-EDTA-free, Roche). Protein amounts were quantified using the Bradford reagent assay (Biorad) and 40-70 µg were loaded into 4-12% NU-PAGE gels (Invitrogen). Following electrophoresis and protein transfer onto PVDF membranes, membranes were blocked for 1 h in a 5% milk/PBS-Tween 0.05% solution and incubated overnight with primary antibody (1:2000 anti-Gem ([42]), 1:400 anti-p24 (TP-7 clone, Zeptometrix), 1:4,000 anti-Flag M2 (Sigma), 1:40,000 anti-β-actin (AC74, Sigma), anti-GAPDH (Novus, NB300-322), 1:1000) and anti-βtubulin (Santa Cruz, H-235). The next day, membranes were washed and incubated either with anti-rabbit or with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare). Membranes were then developed using the Super-Signal West Pico (Pierce/Thermoscientific) or ECL plus kit (GE Healthcare).

#### Immunofluorescence

HeLa cells were transfected with 200 ng of pSG5M-HA-Gem or pSG5M backbone plasmid using Effectene reagent (Qiagen) following manufacturer's instructions. Peripheral Blood Lymphocytes (PBLs) were electroporated with 5 µg of pSG5M-HA-Gem. Gem transduced MOLT4 and Gem electroporated PBLs were seeded on 0.01% poly-L-lysine (Sigma) coated coverslip before fixation in 4% PFA solution (Sigma). Twenty-four (Hela) or 48 hours later (PBLs), cells were fixed in 4% PFA solution (Sigma) for 20 min, neutralized with NH<sub>4</sub>Cl for 10 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma) for 5 min. Following PBS washes, cells were incubated with a 5% PBS/ milk solution then with anti-HA (Sigma, H6908, 1:150 dilution in 5% PBS/milk) or anti-Flag M2 (Sigma) antibody (1:1000 dilution in 5% PBS/milk) for 1 h at room temperature. F-actin was stained with Rhodamine Phalloidin toxin (R415 300U, Life Technologies). Samples were then incubated with FITC-conjugated goat anti-IgG rabbit (Vector Laboratories) (1:100) or with CY3-conjugated goat anti-IgG mouse (Amersham Biosciences) at a 1/1000 dilution in 5% PBS/milk for 1 h at room temperature. For the immunofluorescence of Gem performed in transduced Molt4, samples were incubated with DyLight 649-conjugated sheep anti-IgG rabbit (STAR36D649 AbD serotec). Nucleic acids were stained with DAPI-containing mounting medium (DAPI Fluormount G, Southern biotech) and cells were visualized and signals acquired with a spectral Leica SP5 confocal microscope. Images analyses were performed with the Fiji software [46]. We used Plot Profile tool in Image-J software to create a plot of intensity values across features in our images.

#### Luciferase assays

Forty-eight hours post-transduction with control or Tax lentiviral particles (MOI = 1), 293T cells were transiently transfected, either with a Gem-luc or a Delta-CRE-Gem-luc (500 ng) plasmid [28] using Polyfect reagent (Qiagen). Transfections were carried out in the presence of a phRG-TK vector (10 ng) in order to normalize the results for transfection efficiency. Reporter activities were assayed 24 h post-transfection using the dual-luciferase reporter assay system (Promega) as previously described [47]. Luciferase assays were performed with the GLOMAX microplate luminometer (Promega).

#### Wound healing assay

One hundred twenty thousand Hela cells were seeded in 12well plates. Twenty-four hours later, cells were transduced with either control (Lenti-IRES-GFP) or HA-Gem lentiviral particles (MOI = 1). Seventy hours post-transduction, a wound was performed in the cell monolayer when cells reached confluence. Pictures were then taken every 3 hours up to 12 h post-wounding with a Carl Zeiss Axiovert 135. Distances between the 2 fronts of migration were measured using Image-J software (NIH, USA).

#### Cellular migration assay

MOLT4 or Jurkat cell lines were transduced with control (Lenti-IRES-GFP) or HA-Gem lentiviral particles (MOI = 5). Forty-eight hours later,  $5 \times 10^5$  transduced cells were loaded in the upper chamber of 5 µm polycarbonate transwell filters (Corning). Complete RPMI medium containing or not SDF1/CXCL12 chemo-attractant (150 ng/ml) was added in the lower chamber. Twenty-four hours later, quantification of the number of migrating cells was performed using TruCount flow tubes (BD Biosciences) and flow cytometer Facscalibur4c+HTS (BD biosciences).

HTLV-1-infected cells (C91/PL, Hut102) or non-infected control cells (Jurkat, MOLT4) were transfected with 75 nM of Gem siRNA (ON-TARGETplus smart Pool Gem siRNA L-008717-00-0020, Thermo Scientific) or siRNA control (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Thermo Scientific) using Hiperfect reagent (Qiagen).  $5 \times 10^5$  transfected cells were loaded in the upper chamber of 5 µm polycarbonate transwell filters (Corning) whereas complete RPMI medium was added in the lower chamber. Quantification was performed as described above.



**Figure 11. Gem is directly involved in cell-to-cell conjugates formation and virus transfer.** (A): Jurkat T-cells were labeled with CellTracker Red CMPTX (577 nm, 2  $\mu$ M, Invitrogen). HTLV-1-infected cells (Hut102) were transfected with (right panel) 75 nM of Gem or (left panel) control siRNA. Twenty-four hours later, Hut102 were mixed with Jurkat at a 1:1 ratio on 0.01% poly-L-lysine (Sigma) treated Lab-Tek (Nunc) and incubated for 1 h at 37°C. Cells were visualized and signals acquired with an Axioimager Z1 microscope (Zeiss). White arrows represent the cell-to-cell conjugates. (B): Graph represents the results of 3 independent experiments. (C) Hut102 cells were transfected either with 75 nM of Gem siRNA or with control siRNA. Forty-eight hours later, those cells were cocultured with target Jurkat cells labelled with CellTracker Red CMPTX (577 nm, 2  $\mu$ M, Invitrogen). After 20 min of co-culture, the percentage of gag p19 positive Jurkat cells was determined by flow cytometry. Graph represents the results of 3 independent experiments. (D) C91/PL cells were transfected with 75 nM control or Gem siRNA together with a GFP plasmid. Twenty-four hours later GFP positive cells were harvested by cell sorting. Productive viral infection was measured using BHK1E6 cells that carry the lacZ gene driven by the HTLV-1 LTR promoter. The graph represents the average and standard deviation of three independent wells. The level of Gem and  $\beta$ -tubulin in the GFP positive cells is shown as indicated. \*: significantly different.

doi:10.1371/journal.ppat.1003917.g011

#### Conjugate formation

Jurkat T-cells were stained (CellTracker Red CMPTX 577 nm, 2 µM, Invitrogen) in RPMI-GLUTAMAX-I (Gibco, Invitrogen) in the absence of FBS for 30 min at 37°C. Cells were then washed and incubated in RPMI complete media for 45 min. HTLV-1infected cell lines (C91/PL, Hut102 and MT-2) were transfected with 75 nM of Gem siRNA or control siRNA (Thermo Scientific) using Hiperfect reagent (Qiagen). After twenty-four hours, these cells were mixed with pre-stained Jurkat-T cells (ratio 1:1) on 0.01% poly-L-lysine (Sigma) treated Lab-Tek (Nunc) and incubated for 1 h at 37°C. Cells were then fixed (4% Formalin, Sigma) for 20 min at room temperature and mounted in DAPI Fluormount G (Southern biotech). Signals were acquired with an Axioimager Z1 microscope (Zeiss). At least 15 pictures were taken for each condition and more than 1000 HTLV-1-infected cells were counted per condition. Image analyses were performed with the Image-J software. Data are presented as the mean from 3 independent experiments.

#### Analysis of cell-to-cell HTLV-1 transfer and infection

Hut-102 cells were transfected either with Gem siRNA (ON-TARGETplus smart Pool Gem siRNA L-008717-00-0020, Thermo Scientific) or with control siRNA (ON-TARGETplus Nontargeting Pool, Thermo Scientific). Forty-eight hours post-transfection, these cells were co-cultured with CellTracker Red (2  $\mu$ M, Invitrogen) CMPTX-labelled Jurkat target cells for 20 min. Donor and target cells were mixed at a concentration of 10<sup>5</sup> cells/mL each. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with triton 0,05%, and stained for intracellular p19 expression (Zeptometrix Corporation). Analysis was performed with a FACSCalibur flow cytometer (BD biosciences).

Transfer of infectious virus was measured using BHK1E6 cells that contain a lacZ reporter gene driven by the HTLV-1 LTR promoter [48]. C91/PL cells were transfected with 75 nM control or Gem siRNA and 0.05 µg of pMax-GFP plasmid using the Human T cell Nucleofector Kit, program O-017 (Lonza, Basel, Switzerland) as described by the manufacturer. Twenty-four hours after transfection, GFP positive cells were harvested by cell sorting on a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA). GFP<sup>+</sup> cells were rested for one hour in complete media and then  $1 \times 10^{5}$  cells were co-cultured with a monolayer of  $1 \times 10^{5}$  BHK1E6 cells, in a 6-well poly-lysine coated plate. After one hour of coculture, GFP<sup>+</sup> cells were removed, BHK1E6 cells washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and cultured in fresh media for 24 hours. The next day, monolayers were washed twice with PBS and assayed using a β-galactosidase Staining Kit according to manufacturer's directions (Active Motif, Carlsbad, CA). After staining,  $\beta$ -galactosidase expressing cells were counted by brightfield microscopy.

#### Statistical analyses

Analyses were performed in GraphPad Prism software Version 5.0b. When considering spontaneous migration of lymphocytes, chemotaxis to SDF-1 or cell-to-cell transfer, 1-tailed Student's *t*-tests and one-way ANOVA (with Dunnet post-hoc test) were used to compare the mean between 2 and 3 groups respectively. For quantification of wound healing assay or conjugate formation, Mann-Whitney test were performed. For quantification of promoter activation, i.e. luciferase assays, repeated one-way ANOVA (with Tukey post-hoc test) were used. *P* values less than .05 were considered significant.

#### Measure of p19 in the cell-culture supernatant

One million HTLV-1-infected cells (C91/PL) were transfected with 75 nM of Gem siRNA (ON-TARGETplus smart Pool Gem siRNA L-008717-00-0020, Thermo Scientific) or control siRNA (ON-TARGETplus Nontargeting Pool, Thermo Scientific) using Hiperfect reagent (Qiagen). Twenty-four, forty-eight or seventytwo hours post-transfection, supernatants were collected and centrifuged at 2 000 rpm for 3 min. Supernatants were diluted in RPMI complete media (1:100) and p19 levels were assessed using the RETROtek HTLV p19 Antigen ELISA kit (Zeptometrix Corporation) following manufacturer instructions.

#### **Supporting Information**

Figure S1 Gem expression does not alter p19 gag release in the cell culture supernatant. C91/PL (HTLV-1 positive) cells were transfected with 75 nM of Gem or control siRNA. Cell culture supernatants were collected twenty-four, forty-eight or seventy-two hours post transfection, and p19 gag levels were assessed using RETROtek HTLV p19 Antigen ELISA kit.

#### (TIF)

Table S1 Retrospective database analysis on HTLV gene expression profiles of Tax expressing lymphocytes, HTLV-1-infected cells lines or HTLV-1 immortalized cells. We focused our attention on publications involving gem/kir (italic). Affymetrix probes set number are presented in this table. (TIF)

#### Acknowledgments

We thank Dr. Y. Ward and Dr. M. Montminy for the gift of the Gem antibody, gem expression plasmids and gem-luc plasmids. We thank K McKinnon from the FACS core facility of CCR, NCI, NIH for cell sorting. We thank the different members of the Mahieux laboratory for their helpful suggestions and Dr. S. Calattini for technical help. We thank the PLATIM imaging facility. Illustrations were realized thanks to Servier Medical Art.

#### **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: SAC JT PVA CAPM RM AC. Performed the experiments: SAC JT AC CAPM PVA. Analyzed the data:

#### References

- Gessain A, Cassar O (2012) Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol 3: 388.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H (1977) Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood 50: 481–492.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, et al. (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet 2: 407–410.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, et al. (1986) HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet 1: 1031–1032.
- Boxus M, Willems L (2009) Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. Br J Cancer 101: 1497–1501.
- Currer R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, et al. (2012) HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. Front Microbiol 3: 406.
- Journo C, Douceron E, Mahieux R (2009) HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. Future Microbiol 4: 425–440.
- Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C (2010) HTLV-I Tax-dependent and independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. Blood 115: 2441–2448.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, et al. (2006) Thymusderived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human Tlymphotropic virus type I. Nat Med 12: 466–472.
- Derse D, Hill SA, Lloyd PA, Chung H, Morse BA (2001) Examining human Tlymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. J Virol 75: 8461–8468.
- Pique C, Jones KS (2012) Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. Front Microbiol 3: 378.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, et al. (2003) Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. Science 299: 1713–1716.
- Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, et al. (2010) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. Nat Med 16: 83–89.
- Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR (2005) Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. J Biol Chem 280: 29653–29660.
- Nejmeddine M, Negi VS, Mukherjee S, Tanaka Y, Orth K, et al. (2009) HTLVl-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubuleorganizing center at the virological synapse. Blood 114: 1016–1025.
- organizing center at the virological synapse. Blood 114: 1016–1025.
  16. Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, et al. (2008) Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. PLoS One 3: e2251.
- Chevalier SA, Durand S, Dasgupta A, Radonovich M, Cimarelli A, et al. (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.
- Ward Y, Kelly K (2006) Gem protein signaling and regulation. Methods Enzymol 407: 468–483.
- Kelly K (2005) The RGK family: a regulatory tail of small GTP-binding proteins. Trends Cell Biol 15: 640–643.
- Opatowsky Y, Sasson Y, Shaked I, Ward Y, Chomsky-Hecht O, et al. (2006) Structure-function studies of the G-domain from human gem, a novel small Gprotein. FEBS Lett 580: 5959–5964.
- Correll RN, Pang C, Niedowicz DM, Finlin BS, Andres DA (2008) The RGK family of GTP-binding proteins: regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling. Cell Signal 20: 292–300.
- Maguire J, Santoro T, Jensen P, Siebenlist U, Yewdell J, et al. (1994) Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. Science 265: 241– 244.
- Hatzoglou A, Ader I, Splingard A, Flanders J, Saade E, et al. (2007) Gem associates with Ezrin and acts via the Rho-GAP protein Gmip to down-regulate the Rho pathway. Mol Biol Cell 18: 1242–1252.
- Suyama E, Kawasaki H, Nakajima M, Taira K (2003) Identification of genes involved in cell invasion by using a library of randomized hybrid ribozymes. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 5616–5621.
- Kress AK, Kalmer M, Rowan AG, Grassmann R, Fleckenstein B (2011) The tumor marker Fascin is strongly induced by the Tax oncoprotein of HTLV-1 through NF-kappaB signals. Blood 117: 3609–3612.
- Ng PW, Iha H, Iwanaga Y, Bittner M, Chen Y, et al. (2001) Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed

SAC JT JNB CAPM RM PVA AC. Contributed reagents/materials/ analysis tools: JNB AG. Wrote the paper: SAC JT AG CAPM RM AC PVA.

lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. Oncogene 20: 4484–4496.

- Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, et al. (2002) Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. Cancer Res 62: 3562–3571.
- Conkright MD, Guzman E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, et al. (2003) Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. Mol Cell 11: 1101–1108.
- Kwok RP, Laurance ME, Lundblad JR, Goldman PS, Shih H, et al. (1996) Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. Nature 380: 642–646.
- Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, et al. (2002) The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. J Cell Biol 157: 291–302.
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell 84: 371–379.
- Varrin-Doyer M, Nicolle A, Marignier R, Cavagna S, Benetollo C, et al. (2012) Human T lymphotropic virus type 1 increases T lymphocyte migration by recruiting the cytoskeleton organizer CRMP2. J Immunol 188: 1222–1233.
- Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, et al. (2007) Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. J Immunol 179: 2576–2583.
- Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, et al. (2010) Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 20738–20743.
- Riento K, Ridley AJ (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 446–456.
- Wu Y, Yoder A, Yu D, Wang W, Liu J, et al. (2008) Cofilin activation in peripheral CD4 T cells of HIV-1 infected patients: a pilot study. Retrovirology 5: 95.
- Yoder A, Yu D, Dong L, Iyer SR, Xu X, et al. (2008) HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. Cell 134: 782–792.
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, et al. (2000) Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. J Biol Chem 275: 23973–23980.
- Jayo A, Parsons M, Adams JC (2012) A novel Rho-dependent pathway that drives interaction of fascin-1 with p-Lin-11/Isl-1/Mec-3 kinase (LIMK) 1/2 to promote fascin-1/actin binding and filopodia stability. BMC Biol 10: 72.
- Li Q, Lu F, Wang K (2012) Modeling of HIV-1 infection: insights to the role of monocytes/macrophages, latently infected T4 cells, and HAART regimes. PLoS One 7: e46026.
- Nagata K, Ohtani K, Nakamura M, Sugamura K (1989) Activation of endogenous c-los 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.
- Ward Y, Spinelli B, Quon MJ, Chen H, Ikeda SR, et al. (2004) Phosphorylation of critical serine residues in Gem separates cytoskeletal reorganization from down-regulation of calcium channel activity. Mol Cell Biol 24: 651–661.
- Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, 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.
- 44. Cho SJ, Lee SS, Kim YJ, Park BD, Choi JS, et al. (2010) Xylocydine, a novel Cdk inhibitor, is an effective inducer of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. Cancer Lett 287: 196–206.
- Zhou M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R, et al. (2006) Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. J Virol 80: 4781–4791.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frisc E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9: 676– 682.
- Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, Turpin J, Vinera J, et al. (2013) Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. J Virol 87: 1123–1136.
- Astier-Gin T, Portail JP, Lafond F, Guillemain B (1995) Identification of HTLV-I- or HTLV-II-producing cells by cocultivation with BHK-21 cells stably transfected with a LTR-lacZ gene construct. J Virol Methods 51: 19–29.



> L'étude des pathologies humaines est souvent limitée par l'absence de modèle animal approprié. La souris est le modèle le plus fréquemment utilisé pour l'étude des maladies infectieuses humaines. Cependant, un grand nombre d'agents infectieux spécifiques de l'homme n'infectent pas la souris. Ces vingt dernières années, la greffe de cellules progénitrices ou de tissus humains chez des souris immunodéficientes a permis de générer des souris dites humanisées. Bien que ces modèles demandent encore à être améliorés, ils ont permis de reproduire chez la souris certains aspects des pathologies humaines et laissent ainsi espérer le développement dans un futur proche de thérapies innovantes. <

# Les souris ne sont pas des hommes et pourtant...

# Ce que les souris humanisées nous apprennent sur les maladies infectieuses

Anne Cachat<sup>1,2</sup>, Julien Villaudy<sup>1,2</sup>, Dominique Rigal<sup>3</sup>, Louis Gazzolo<sup>1,2</sup>, Madeleine Duc Dodon<sup>1,2</sup>



<sup>1</sup>Virologie humaine, INSERM-U758, École normale supérieure, <sup>2</sup> UMS 3444 BioSciences Lyon-Gerland, 69364 Lyon Cedex 07, France; <sup>3</sup> Établissement français du sang, 1-3, rue du Vercors, 69007 Lyon, France. madeleine.duc.dodon@ens-lyon.fr A. Cachat et J. Villaudy ont contribué de façon équivalente à la rédaction de ce manuscrit.

Pour servir de modèle d'étude à un processus pathologique observé chez l'homme, un animal devrait offrir les propriétés idéales suivantes : une descendance nombreuse, un développement rapide, une taille réduite et un entretien facile. La souris (Mus musculus) présente de telles caractéristiques qu'elle partage avec d'autres espèces animales, comme le ver nématode (Caenorhabditis elegans), la mouche du vinaigre (Drosophila melanogaster) et le poisson zèbre (Danio rerio).

La souris de laboratoire vient de fêter son centième anniversaire : c'est en effet en 1909 que la première souche isogénique de mammifère a été obtenue et identifiée. Il s'agit de la souche de souris DBA (dilute brown non-agouti). Cette population d'individus génétiquement identiques représentait alors le groupe témoin essentiel à toute expérimentation biologique. Depuis, la souris est considérée comme le meilleur modèle animal, un « top model » taillé sur mesure pour la recherche. Les premières souris « humanisées » sont apparues dans les années 1980 : ce sont les souris transgéniques dans le génome desquelles a été inséré un gène humain pour en étudier l'expression et la fonction. Ainsi, certaines de ces souris appelées xenomouse ont été utilisées pour produire des anticorps humanisés [1, 39]. Il faut toutefois admettre que ce

m/s n° 1, vol. 28, janvier 2012

DOI: 10.1051/medsci/2012281018

qualificatif « humanisées » convient davantage aux souris greffées avec des cellules ou tissus humains. Ce sont ces dernières qui font l'objet de cette revue, car elles représentent, à ce jour, un outil très performant pour la recherche biomédicale.

# De l'immunodéficience à l'humanisation

### Un grand choix de souris immunodéficientes

Seules des souris immunodéficientes se prêtent à la reconstitution d'un système hématolymphoïde humain et sont capables de générer des réponses immunitaires innées et adaptatives humaines. La réussite de la prise de greffe des cellules humaines transplantées chez ces souris - et, dans le cas dont il est question ici, de cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH) humaines - est conditionnée par l'absence de lymphocytes T et B murins, mais surtout par celle des cellules murines natural killer (NK).

Les principales souches de souris immunodéficientes qui ont été utilisées pour le développement des souris humanisées au cours des récentes décennies sont présentées dans la Figure 1.

Pour mémoire, citons d'abord les souris nude athymiques, décrites en 1966, qui ne produisent pas de lymphocytes T. En 1983, les souris CB17-scid (severe combined immunodeficiency) ont été obtenues [2]. Elles présentent une mutation autosomale récessive du gène prkdc (protein kinase DNA activated catalytic polypeptide) codant pour une protéine impliquée dans les recombinaisons V(D)J nécessaires aux

63



Figure 1. Représentation schématique de la chronologie de la production des différentes souches de souris immunodéficientes utilisées pour la transplantation de cellules ou tissus humains. BLT : bone marrow liver thymus ; CPH : cellule progénitrice humaine ; DBA : dilute brown non aguti ; FAH : fumaryl acetate hydrolase ; FRG : FAH rag gamma ; IL2Rγ : interleukin-2 receptor gamma chain ; NOD : non obese diabetic ; NSG : NOD-SCID gamma c ; Rag : recombination-activating gene ; SCID : severe combined immuno-deficiency.

réarrangements des récepteurs des cellules T et des immunoglobulines (Ig). Cependant, une forte activité des cellules murines NK limitait la prise de greffe de cellules humaines provenant de tissus hématopoïétiques fœtaux (foie, thymus) ou celle de cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH) humaines CD34<sup>+</sup>, empêchant le développement d'un système immunitaire [3, 4]. De même, le système immunitaire humain ne s'établit pas non plus chez les souris immunodéficientes NOD (*non-obese diabetic*)-SCID, malgré une activité réduite des cellules murines NK [5]. Mais la forte incidence de thymomes observés chez ces souris réduit leur durée de vie, ce qui empêche la réalisation de longues expériences.

Cependant, les souris NOD-SCID ont permis, après implantation de foie et de thymus de fœtus humains sous la capsule rénale, de générer les souris humanisées BLT (pour bone marrow, liver, thymus) : l'implantation des tissus humains est suivie d'une irradiation sous-létale et d'une injection intraveineuse de CPH CD34<sup>+</sup> isolées du même foie fœtal [6]. On observe une reconstitution avec présence de cellules hématopoïétiques humaines circulantes (lymphocytes T, B, monocytes, cellules dendritiques). La thymopoïèse humaine se développe exclusivement dans l'implant thymique humain : l'éducation des cellules T s'y déroule dans le contexte d'un CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) humain, comme le confirme la restriction HLA-A1 et HLA-A2 des réponses des cellules T à l'infection par le virus d'Epstein-Barr in vivo [6]. De plus, ces souris sont capables d'une forte production d'anticorps (IgG) après leur immunisation avec des antigènes T-dépendants in vivo. Elles produisent aussi des cytokines inflammatoires en réponse à la toxine du syndrome du choc toxique [6]. Enfin, des cellules B, des cellules T, des monocytes/macrophages, des cellules NK et des

cellules dendritiques sont présentes dans l'épithélium intestinal, ainsi que dans les poumons et les muqueuses rectales et vaginales. Cependant, la mise en œuvre de ce protocole est très laborieuse, ce qui explique que le modèle BLT soit rarement utilisé.

Plus récemment, des souris  $IL2R\gamma^{-/-}$  présentant une mutation du locus de la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'interleukine 2 (IL2R $\gamma$  ou  $\gamma$ c pour chaîne commune aux récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) ont été générées. Cette mutation empêche le développement des cellules NK. Ces souris ont été croisées, soit avec les souris NOD-SCID pour obtenir les souris NOD-SCID- $\gamma c^{-/-}$  (NSG) [7, 8], soit avec les souris BALB/c- $Rag2^{-/-}$ , chez lesquelles la mutation Rag2 empêche les recombinaisons V(D)J, pour obtenir les souris BALB/c- $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  (BRG) [9].

### Les conditions d'une reconstitution hématolymphoïde humaine complète et fonctionnelle chez les souris NSG et BRG

Ces deux souches de souris, qui ne développent pas spontanément de tumeurs et sont génétiquement très stables, sont complètement dépourvues de lymphocytes murins T, B, et de cellules NK. Ces souris sont, à ce jour, les plus utilisées pour étudier les paramètres essentiels à la reconstitution chez ces animaux d'un système hématolymphoïde humain et au développement d'un système immunitaire fonctionnel.

L'inoculation intrahépatique ou intracardiaque de CPH humaines CD34<sup>+</sup> préparées à partir de sang de cordon dans des souriceaux âgés de 24 à 48 h préalablement irradiés représente le protocole idéal [10]. L'efficacité de la greffe de ces CPH autorise la mise en place et le développement d'un système immunitaire humain fonctionnel avec une thymopoïèse humaine active. Celle-ci se développe dans le rudiment thymique murin qui est colonisé par des cellules humaines produites *de novo* dans la moelle osseuse des souris [9, 11, 12]. Il faut noter que les thymocytes humains sont éduqués principalement contre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) murin avant leur maturation en lymphocytes T. Puis ils sortent du thymus pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires. Deux à trois mois plus tard, des lymphocytes T et B humains sont détectés dans le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate, et les ganglions lymphatiques (voir Tableau I). Le nombre de lymphocytes T et B, plus élevé dans les souris NSG que dans les souris BRG, souligne que le fonds génétique NOD est plus permissif à la greffe xénogénique de cellules humaines que le fonds BALB/c. Cette différence est probablement due à une variabilité de l'activité macrophagique, liée notamment à l'expression de différents allèles du gène Sirp $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ )<sup>1</sup> [13]. Ces modèles autorisent la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Outre la présence de cellules humaines NK, celle de cellules myélomonocytaires et dendritiques, dont des cellules dendritiques plasmacytoïdes, souligne l'établissement d'une réponse immunitaire innée [7, 9, 14, 15]. La production d'anticorps (IgM/IgG) par les lymphocytes B en réponse à une immunisation contre la toxine tétanique est très faible, ce qu'explique l'absence de collaboration entre les lymphocytes T et B chez ces souris chimères, conséquence de la non-expression des molécules HLA (human leukocyte antigens). Enfin, la détection dans la muqueuse intestinale de lymphocytes B sécrétant des IgA témoigne d'une possible reconstitution de l'immunité mucosale [7].

### De l'humanisation à l'infectiologie

La mise au point, au cours de la dernière décennie, des souris humanisées BLT, NSG et BRG a permis l'étude de divers agents pathogènes humains d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, ce que ne permettaient pas de manière convaincante les modèles animaux traditionnels (pour revues voir [16-18]). L'utilisation des souris humanisées permettra de préciser les mécanismes moléculaires et cellulaires de la pathogenèse, de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques et de procéder à une évaluation préclinique des modalités de prévention vaccinale. Cette recherche translationnelle devrait aboutir à des avancées majeures dans le traitement des maladies infectieuses humaines. Nous analysons ici quelques exemples illustrant l'apport des souris humanisées à l'étude des virus ciblant les cellules du système immunitaire humain. Il s'agit des virus lymphotropes et

### VIH, virus du syndrome de l'immunodéficience acquise

Un des premiers virus étudiés dans ce modèle de souris humanisées est le VIH, lentivirus à la fois lymphotrope et monocytotrope [19]. L'infection des souris BRG par ce virus reproduit chez ces souris des aspects spécifiques de la maladie, par exemple la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la virémie et la dissémination du virus dans les organes lymphoïdes [20-22]. Cependant, la réponse des cellules B anti-VIH restant très faible dans ce modèle, les études se sont principalement focalisées, chez ces souris humanisées, sur les phases précoces de l'infection, notamment sur la transmission du virus au niveau des muqueuses vaginale et rectale. Ces muqueuses sont constituées de cellules T, de macrophages et de cellules dendritiques humaines. Lorsque le VIH est directement injecté dans les cavités vaginale ou rectale, l'infection est systémique dès la première semaine [21]. Ce modèle d'étude est très prometteur pour la validation in vivo de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à empêcher la transmission du virus au niveau des muqueuses. Dans ce contexte, rappelons qu'un essai de thérapie génique utilisant les shARN (ou ARN en épingle à cheveu) a donné des résultats intéressants [23].

Notons enfin que les souris humanisées permettent l'étude des co-infections. C'est, par exemple, le cas du virus du sarcome de Kaposi qui se réplique chez ces souris en présence ou en absence d'infection par le VIH, et celui de co-infections par le parasite Toxoplasma gondii responsable d'encéphalites [18].

#### HTLV-1, virus de la leucémie T de l'adulte

Le deltarétrovirus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1), qui infecte 15 à 20 millions d'individus dans le monde, est l'agent étiologique de deux pathologies : la leucémie T de l'adulte ou ATL et une maladie neurodégénérative invalidante, la paraparésie spastique tropicale ou TSP/HAM [24]. Comme pour le VIH, aucun petit modèle traditionnel n'a permis de reproduire l'infection et la pathogenèse in vivo. Le modèle des souris scid humanisées BLT (bone marrow, liver, thymus) a été d'abord utilisé pour comparer la greffe de cellules CPH préalablement infectées par HTLV-1 à celle de cellules de lignées établies transformées par ce virus [25]. Les auteurs ont

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> SIRPa est un récepteur présent sur les macrophages, les neurones, les cellules dendritiques, dont le ligand est la molécule transmembranaire CD47. Il régule négativement la phagocytose et se lie aux tyrosine phosphatases intracytoplasmiques SHP-1 and SHP-2.



hémorragique, parfois mortelle. Il est transmis à l'homme par des moustiques qui jouent à la fois le rôle de vecteurs et de réservoirs. Des souris NOD-scid, greffées avec des CPH puis infectées par voie sous-cutanée avec le virus, ce qui mime la transmission par les moustiques, développent des signes cliniques identiques à ceux observés chez l'homme : fièvre, érythème et thrombocytopénie [28]. De même, des souris BRG humanisées ayant reçu une greffon de CPH puis secondairement infectées par le virus de la dengue. développent pendant trois semaines une virémie élevée accompagnée d'une fièvre importante [29]. La

Figure 2. Stratégies mises en œuvre pour établir les modèles de souris humanisées adaptés à l'étude des maladies infectieuses humaines. Voir texte pour détails et [16, 18, 32].

montré que le virus était retrouvé dans les biopsies de foie et de thymus à distance de la greffe, mais n'entraînait pas d'infection systémique.

Les souris humanisées ont récemment contribué à l'étude des mécanismes de l'activité leucémogène de ce virus in vivo [26]. Ainsi, quand les CPH CD34<sup>+</sup> infectées ex vivo par le virus HTLV-1 sont transplantées dans des souris NSG, ces souris développent exclusivement des lymphomes T CD4<sup>+</sup> semblables à ceux retrouvés chez les patients ATL, et l'intégration du provirus est détectée dans les progéniteurs présents dans la moelle osseuse. Les auteurs concluent que les CPH de la moelle osseuse seraient le réservoir du virus in vivo et représentent les cellules cibles de la transformation par HTLV-1 chez l'homme. Nous avons utilisé une approche différente pour étudier les étapes précoces de l'infection par HTLV-1. Des souris BRG humanisées sont infectées par injection intrapéritonéale de cellules irradiées productrices d'HTLV-1, une fois le développement du thymus humain achevé. L'infection, attestée par une charge provirale élevée dans les thymocytes et les splénocytes humains, perturbe la maturation des thymocytes, provoque une augmentation du nombre de lymphocytes T dans les organes périphériques et induit des pathologies caractéristiques de l'ATL. Ces résultats suggèrent que, chez l'homme, l'infection par HTLV-1 des thymocytes immatures est un événement favorisant le développement de leucémies/lymphomes [27].

#### Virus de la dengue

Ce virus de la famille des Flaviviridae est le plus souvent à l'origine d'une fièvre bénigne chez les individus infectés (50 à 100 millions par an dans le monde), mais dans de rares cas il induit une fièvre production précoce d'anticorps de type IgM est suivie de celle d'anticorps IgG, dont certains sont neutralisants. Récemment, des souris NSG, exprimant la molécule humaine HLA-A2 ont été utilisées. Chez ces souris, l'éducation intrathymique des cellules T humaines s'effectue au contact des molécules HLA-A2 humaines exprimées par les cellules de souris. Ces souris humanisées reçoivent une injection de CPH HLA-A2<sup>+</sup>, puis elles sont infectées par le virus de la dengue [30]. Des splénocytes humains sont ensuite isolés et stimulés *ex vivo* par des peptides viraux restreints par HLA-A2. La sécrétion d'interféron  $\gamma$ , de TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) et d'interleukine-2 reflète la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les souris NSG mais uniquement si elles expriment HLA-A2.

#### VHB et VHC, virus des hépatites

Les hépatocytes humains sont les cellules cibles de plusieurs agents pathogènes, parmi lesquels les virus des hépatites B et C (VHB, de la famille des *Hepadnaviridae* et VHC, de la famille des *Flaviviridae*), qui infectent 800 millions d'individus dans le monde. Pour mieux comprendre la pathogenèse de ces infections virales, des souris immunodéficientes ont été croisées avec des souris transgéniques pour un gène exprimant une protéine cytolytique pour les hépatocytes murins. Cette cytolyse hépatique est un stimulus pour la régénération hépa-

Tissu	Pourcentage de cellules hCD45*			
	Cellules B	Cellules T	Cellules myéloïdes	Cellules dendritiques
Moelle osseuse	78 à 90	3,8 à 15,1	4,7 à 11,6	1,6 à 4,4
Rate	50 à 85	1,0 à 39,2	6,4 à 11,4	1,4 à 3,3
Thymus	2,1 à 3,2	95 à 98	-	-
Sang périphérique	49 à 76	5,2 à 27,8	5,6 à 13,4	_

Tableau I. Composition cellulaire du système hématolymphoïde humain observé dans des souris humanisées. Les CPH CD34<sup>+</sup> humaines, isolées à partir de sang placentaire, ont été inoculées par voie intrahépatique dans des souriceaux NSG ou BRG nouveau-nés, préalablement irradiés avec une dose sous-létale. L'analyse a été faite 2 à 3 mois après la greffe.

tique. C'est le cas chez les souris urokinase-type plasminogen activator uPA/Rag2<sup>-/-</sup> [31]. Lorsque ces souris sont greffées avec des hépatocytes adultes humains, puis infectées par le VHB, on observe les stigmates d'une infection productive. Plus récemment, des souris qui n'expriment pas la fumaryle acétate hydrolase (FAH) ont été croisées avec des souris immunodéficientes (souris FAH<sup>-</sup>/BRG). L'absence de cet enzyme conduit à la destruction du foie murin [32, 33]. Ces souris FAH<sup>-</sup>/BRG, lorsqu'elles sont transplantées avec des hépatocytes adultes humains, montrent un chimérisme hépatique humain/souris élevé, corrélé à la quantité d'albumine humaine détectable dans le sérum. Ces souris chimériques sont sensibles à l'infection par le VHB et le VHC, comme l'indique la détection des antigènes viraux dans le foie chimérique de ces animaux. De plus, les souris infectées par le VHC répondent au traitement antiviral. Récemment, des souris BRG transgéniques ont été obtenues, qui expriment de façon inductible une protéine de fusion (FK506 binding protein-caspase 8). Son induction entraîne la dimérisation de la caspase 8 et son activation, ce qui provoque la mort des hépatocytes murins [34]. Ces souris sont ensuite greffées à la fois avec des CPH (pour une reconstitution hématolymphoïde) et des progéniteurs hépatocytaires (reconstitution hépatique) isolés du même foie fœtal, puis infectées quatre semaines plus tard par le VHC. Elles sont alors capables d'une réponse immunitaire humaine T spécifique du VHC et développent des hépatites et des fibroses. Ces souris, constituées à la fois d'hépatocytes humains et de cellules immunitaires humaines, illustrent le potentiel de ce modèle pour étudier l'immunopathogenèse induite par l'infection par les virus hépatotropes. Ce modèle sera également utile pour l'étude de l'étape intrahépatique obligatoire du développement de Plasmodium falciparum, le parasite responsable de la malaria [35].

### Quelles souris humanisées pour l'avenir ?

Actuellement, des protocoles standards relativement faciles à mettre en œuvre pour produire ces souris humanisées sont disponibles [36, 37]. Une des grandes innovations dans ces modèles est la diversité des tissus humains que l'on envisage maintenant de greffer chez ces souris, multipliant ainsi le nombre de maladies humaines modélisables. Certains tissus humains cibles spécifiques d'infections virales peuvent être transplantés dans des souris immunodéficientes : c'est le cas de l'épithélium intestinal pour l'étude des virus entériques [17].

Comment améliorer ces stratégies ? Citons l'ablation des cellules et/ou tissus murins pour créer de « l'espace », soit par irradiation (cas de la greffe de précurseurs hématopoiétiques), soit par modifications génétiques (exemple des hépatocytes humains). On peut aussi essayer d'augmenter la spécificité de la réponse immunitaire des souris humanisées grâce à l'ajout de cytokines humaines, et d'éviter la destruction active de la greffe par la souris [38]. L'éducation des cellules T et B humaines greffées est restreinte du fait de la non-expression des molécules HLA. C'est la limitation majeure inhérente à ce modèle de souris humanisées. L'expression transgénique des molécules HLA pourrait améliorer les sélections positive et négative des lymphocytes T et la réponse immunitaire [30, 40]. Il faut espérer un effet synergique de chacune de ces améliorations ce qui permettrait d'obtenir, dans un avenir très proche, le modèle animal le plus performant pour l'étude des virus, bactéries et autres agents pathogènes humains, ainsi que pour le développement de thérapies innovantes et de vaccins [15]. ◊

#### SUMMARY

#### Mice are not Men and yet... How humanized mice inform us about human infectious diseases

The study of human pathologies is often limited by the absence of animal models which are robust, costeffective and reproduce the hallmarks of human infections. While mice have been frequently employed to study human diseases, many of important pathogens display unique human tropism. These last two decades the graft of human progenitor cells or tissues into

immunodeficient mice has allowed the elaboration of so called humanized mice. Humanized mouse technology has made rapid progress, and it is now possible to achieve high levels of human chimerism in various organs and tissues, particularly the immune system and the liver. The review briefly summarizes the different models of humanized mice available for *in vivo* experiments. With a focus on lymphotropic, monocytotropic and hepatotropic viruses, we here discuss the current status and future prospects of these models for studying the pathogenesis of infectious diseases. Furthermore, they provide a powerful tool for the development of innovative therapies. ♦

#### **CONFLITS D'INTÉRÊTS**

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### REMERCIEMENTS

Le travail de notre laboratoire sur l'étude de l'infection par HTLV-1 des souris humanisées est soutenu par l'Inserm, par le projet Européen Infection and Cancer (INCa) du sixième Research Framework Program (n° LSHC-CT-2005-018704) et par la Fondation de France, comité leucémie (n°RAF09001CCA).

### RÉFÉRENCES

- Bellet D, Pecking A, Dangles-Marie V. XenoMouse : un tour de force pour l'obtention d'anticorps humains chez la souris. Med Sci (Paris) 2008; 24: 903-5.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 1983; 301: 527-30.
- Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988; 335: 256-9.
- McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse : murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 1988; 241 : 1632-9.
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. J Immunol 1995; 154: 180-91.
- Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. Nat Med 2006; 12:1316-22.
- Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood 2005; 106: 1565-73.
- Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 324: 53-76.
- Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. Science 2004; 304: 104-7.
- Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL. Humanized mouse models to study human diseases. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010; 17: 120-5.
- Gimeno R, Weijer K, Voordouw A, et al. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup> mice : functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 2004; 104: 3886-93.
- Awong G, LaMotte-Mohs R, Zuniga-Pflucker JC. Key players for T-cell regeneration. Curr Opin Hematol 2010; 17: 327-32.
- Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. Nat Immunol 2007; 8: 1313–23.
- Huntington ND, Di Santo JP. Humanized immune system (HIS) mice as a tool to study human NK cell development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 109-24.
- Manz MG, Di Santo JP. Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. Nat Immunol 2009; 10: 1039-42.
- Legrand N, Ploss A, Balling R, et al. Humanized mice for modeling human infectious disease : challenges, progress, and outlook. Cell Host Microbe 2009; 6:5-9.
- Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol 2007; 7: 118-30.
- Van Duyne R, Pedati C, Guendel I, et al. The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections. Retrovirology 2009; 6:76.
- 19. Baenziger S, Tussiwand R, Schlaepfer E, et al. Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2<sup>-/-</sup> gamma c<sup>-/-</sup> mice. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 15951-6.

- 20. An DS, Poon B, Ho Tsong Fang R, et al. Use of a novel chimeric mouse model with a functionally active human immune system to study human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 391-6.
- Berges BK, Wheat WH, Palmer BE, et al. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2<sup>-/-</sup> gamma c<sup>-/-</sup> (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* 2006; 3:76.
- 22. Gorantla S, Sneller H, Walters L, et al. Human immunodeficiency virus type 1 pathobiology studied in humanized BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup> mice. J Virol 2007; 81: 2700-12.
- Kumar P, Ban HS, Kim SS, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. Cell 2008; 134: 577-86.
- 24. Duc Dodon M, Mesnard JM, Barbeau B. Leucémies T induites par HTLV-1 : y a-t-il un avant et un après HBZ ? Med Sci (Paris) 2010 ; 26 : 391-6.
- 25. Feuer G, Fraser JK, Zack JA, et al. Human T-cell leukemia virus infection of human hematopoietic progenitor cells : maintenance of virus infection during differentiation in vitro and in vivo. J Virol 1996 ; 70 : 4038-44.
- Banerjee P, Tripp A, Lairmore MD, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma development in HTLV-1-infected humanized SCID mice. Blood 2010; 115: 2640-8.
- Villaudy J, Wencker M, Gadot N, et al. HTLV-1 propels thymic human T cell development in "human immune system" Rag2<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup> mice. PLoS Pathogens 2011 7 : e1002231.
- Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. J Virol 2005; 79: 13797-9.
- Kuruvilla JG, Troyer RM, Devi S, Akkina R. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. Virology 2007; 369: 143-52.
- 30. Jaiswal S, Pearson T, Friberg H, et al. Dengue virus infection and virusspecific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. PLoS One 2009; 4 : e7251.
- Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 2001; 33: 981-8.
- De Jong YP, Rice CM, Ploss A. New horizons for studying human hepatotropic infections. J Clin Invest 2010; 120: 650–3.
- 33. Bissig KD, Wieland SF, Tran P, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. J Clin Invest 2010; 120:924-30.
- 34. Washburn ML, Bility MT, Zhang L, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. Gastroenterology 2011; 140: 1334-44.
- 35. Morosan S, Hez-Deroubaix S, Lunel F, et al. Liver-stage development of Plasmodium falciparum, in a humanized mouse model. J Infect Dis 2006; 193: 996-1004.
- 36. Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental model for the study of the human immune system : production and monitoring of "human immune system" Rag2<sup>-/-</sup> gamma c<sup>-/-</sup> mice. *Methods Mol Biol* 2008; 415: 65–82.
- 37. Van Lent AU, Centlivre M, Nagasawa M, et al. In vivo modulation of gene expression by lentiviral transduction in "human immune system" Rag2<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup> mice. Methods Mol Biol 2010; 595: 87-115.
- 38. Willinger T, Rongvaux A, Strowig T, et al. Improving human hematolymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. Trends Immunol 2011; 32:321-7.
- Cogné M, Duchez S, Pascal V. Transgenèse animale et humanisation des anticorps : des souris pour des hommes. Med Sci (Paris) 2009 ; 25 : 1149-54.
- 40. Shultz LD, Saito Y, Najima Y, et al. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma (null) humanized mice. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:13022-7.

**TIRÉS À PART** M. Duc Dodon

# Le rôle ambivalent de l'interféron $\alpha$ dans les infections par HTLV-1 et HTLV-2

HTLV-1 et HTLV-2 sont des virus provoquant des infections persistantes. Après une période de latence clinique de plusieurs décennies, 2 à 5 % des individus infectés par HTLV-1 développent des pathologies comme la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) ou la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM). Malgré une forte homologie avec HTLV-1 dans son organisation génomique et sa séquence nucléotidique, l'infection par HTLV-2 n'est pas associée à des désordres hématologiques. L'interféron lpha (IFN-lpha) est un acteur majeur de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Le rôle de la réponse IFN- $\alpha$  au cours d'une infection par HTLV-1 et notamment dans le développement de l'ATL reste peu documenté et controversé. Mon travail de thèse a consisté à caractériser le rôle de l'IFN- $\alpha$  sur l'infection par HTLV-1 en comparaison de l'infection par HTLV-2. Nous avons montré que l'infection de novo de lymphocytes T par HTLV-1 ou HTLV-2 était inhibée par l'IFN-α. Cette inhibition repose sur l'activation (phosphorylation) de la protéine PKR par l'IFN- $\alpha$  qui réprime les étapes tardives du cycle viral. D'autre part, nous avons étudié le rôle de la protéine ADAR1-p150 dont l'expression est aussi induite par l'IFN-α. La protéine ADAR-1-p150 est surexprimée dans les lymphocytes primaires activés et dans des lymphocytes infectés par HTLV-1 ou HTLV-2. Nous avons montré que la protéine ADAR-1-p150 contrecarrait l'effet inhibiteur de l'IFN- $\alpha$  sur le cycle d'HTLV-1 et d'HTLV-2, grâce à sa capacité à inhiber l'activation de PKR. Ces résultats suggèrent gu'un équilibre entre l'expression de ces 2 protéines peut influer sur le déroulement de l'infection par HTLV-1 ou HTLV-2. Enfin, nous avons observé que l'IFN- $\alpha$  n'avait pas d'effet sur des cellules déjà infectées par HTLV-1 contrairement à HTLV-2 qui reste partiellement sensible à cette cytokine. Un rôle différent de l'IFN- $\alpha$  sur HTLV-1 et HTLV-2 pourrait être à l'origine de la différence de pathogénicité entre les deux virus.

Mots clés : HTLV-1, HTLV-2, ATL, IFN- $\alpha$ 

### The ambivalent role of interferon $\alpha$ in HTLV-1 and HTLV-2 infections

HTLV-1 and HTLV-2 viruses are responsible for life-long infections. After a long latency period, 2 to 5 % of HTLV-1 infected people develop diseases such as Adult T cell leukemia (ATL) or Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 associated Myelopathy (TSP/HAM). Although both viruses are very similar in their genomic organization and in their nucleotide sequence, HTLV-2 has not been associated to any malignant hematological disorders. Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) plays a major role in host innate immune response. The role of IFN- $\alpha$  during HTLV-1 infection and ATL onset has poorly been investigated and results are controversial. My project was aimed at characterizing the role of IFN- $\alpha$  in HTLV-1 infection compared to HTLV-2 infection. We showed that IFN- $\alpha$  inhibits HTLV-1 and HTLV-2 de novo infection in T-cells. This inhibition is mediated through PKR activation (phosphorylation) that prevents the latest steps of the viral cycle. We also studied the effect of ADAR-1-p150 whose expression is also induced by IFN- $\alpha$ . We showed that ADAR-1-p150 counteracts the inhibitory effect of IFN- $\alpha$  on HTLV-1 and HTLV-2 cycles, through inhibition of PKR activation. These results suggest that a balance between ADAR-1-p150 and PKR expression could influence HTLV-1 and HTLV-2 infection. Furthermore we observed that IFN- $\alpha$  has no effect on HTLV-1 infected cells whereas HTLV-2 infected cells are still sensitive to the cytokine. A different effect of IFN- $\alpha$  on HTLV-1 and HTLV-2 could be involved in the distinct pathological outcomes of HTLV-1 or HTLV-2 infection.

Keywords : HTLV-1, HTLV-2, ATL, IFN- $\alpha$