



HAL
open science

L'oncoprotéine Tax du HTLV-1 et la voie NF- κ B : une histoire de conjugaison : nouvelle exploration du rôle des machineries de SUMOylation et d'ubiquitinylation dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax

Sabrina Pène

► **To cite this version:**

Sabrina Pène. L'oncoprotéine Tax du HTLV-1 et la voie NF- κ B : une histoire de conjugaison : nouvelle exploration du rôle des machineries de SUMOylation et d'ubiquitinylation dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax. *Virologie*. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB056 . tel-01343887

HAL Id: tel-01343887

<https://theses.hal.science/tel-01343887>

Submitted on 11 Jul 2016

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 de Doctorat de l'Université
Sorbonne Paris Cité
Paris Descartes**
Spécialité : VIROLOGIE

**Université Sorbonne Paris
Cité (USPC)**
Université Paris Descartes
12 rue de l'École de
Médecine
75270 PARIS Cedex 06

Présentée par :

Sabrina PÈNE

Pour l'obtention du grade de Docteur de
l'Université Sorbonne Paris Cité
Paris Descartes

**Ecole Doctorale Bio
Sorbonne Paris Cité
(BioSPC)**
Université Paris Diderot
UFR Sciences du vivant
Bâtiment Lamarck Aile B
35 rue Hélène Brion
75205 PARIS Cedex 13

*L'oncoprotéine Tax du
HTLV-1 et la voie NF- κ B :
une histoire de conjugaison*

INSTITUT COCHIN
INSERM U1016
CNRS UMR8104
Université Paris Descartes
22 rue Méchain
75014 PARIS

**Nouvelle exploration du rôle des machineries de
SUMOylation et d'ubiquitinylation dans
l'activation de la voie NF- κ B par Tax**

Soutenue le Vendredi 10 Juillet 2015

Devant le jury composé de :

Professeur Claire LEGAY

Docteur Franck MORTREUX

Docteur Luc WILLEMS

Docteur Cécile ARRIEUMERLOU

Docteur Chloé JOURNO

Docteur Claudine PIQUE

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directrice de Thèse

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte »

Louis PASTEUR

A ma famille et mes amis,
Mes plus belles découvertes

REMERCIEMENTS

Ces presque quatre années à l'Institut Cochin ont été riches tant sur les plans scientifiques et professionnels que d'un point de vue personnel, avec de nombreuses rencontres, de grands moments de partage et surtout, de belles amitiés qui resteront. Elles m'ont indéniablement changé et m'ont permis de devenir la scientifique et la personne que je suis à présent. Je ne l'oublierai pas et je ne vous oublierai pas... alors pour tout cela, **MERCI**.

Je souhaite avant tout remercier vivement les membres de mon jury de thèse, le Pr. Claire LEGAY, le Dr. Franck MORTREUX, le Dr. Luc WILLEMS, le Dr. Cécile ARRIEUMERLOU et le Dr. Chloé JOURNO, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer et de discuter de mon travail.

Je remercie plus spécialement le Dr. ARRIEUMERLOU pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour sa collaboration dans le projet TRAF5 et son expertise précieuse.

Pour continuer cet exercice difficile des remerciements, la première personne à laquelle je tiens à adresser un immense Merci, c'est ma directrice de thèse, le **Dr. Claudine PIQUE**. On peut dire que l'on ne s'est pas ennuyé pendant ces quatre années ensemble ! Quel chemin parcouru ! Je te remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé, poussé puis de m'avoir considéré comme une véritable chercheuse pour mener à bien mon projet. Tu as parfaitement accompli ta mission et je n'aurais voulu réaliser cette aventure de la thèse avec aucun autre chercheur. Je voudrais aussi particulièrement te remercier de m'avoir appuyé dans mon choix professionnel post-doctorat et de m'avoir permis de le concrétiser ainsi que pour tes conseils car tous les chercheurs ne l'auraient pas fait. Merci Chef ! Je compte bien que l'on se retrouve pour partager des déjeuners ou quelques petits pas de danse dans ton bureau !

Laëtitia, mon petit Binôme, ces quelques lignes ne seront jamais assez pour te remercier et te dire à quel point tu es importante pour moi. Tu as vécu au quotidien ces quatre années de recherche intensive auprès de moi, qui furent jalonnées d'interrogations vastes et variées, de doutes, de grands bonheurs, de remises en question, d'engagements sur post-it, de chansons, de danses, de gros fous rires et de publications (et oui) !!

Merci de toujours avoir été à l'écoute, attentive et pour tous tes précieux conseils, justes et réfléchis... bref merci d'être devenue une véritable amie (voir plus). Je sais qu'après mon départ, il sera plus difficile pour que l'on se retrouve mais je te promets que nous allons débusquer des moments spéciaux pour cela parce que tu es quelqu'un de rare et qu'une fois que l'on a trouvé son Binôme, il ne faut pas le laisser filer...

Loulou, ah mon Loulou ! Difficile là encore de te dire comme tu comptes pour moi ! J'ai été plus qu'heureuse que l'on partage ces années de thèse ensemble ainsi que toutes les expériences et les interrogations professionnelles, ou non, annexes (nos aventures avec Dede Lafeuille entre autre). Tu es également devenu un ami précieux, sur qui l'on peut compter. Tu es vraiment une belle personne ! Mais nos péripéties sont loin d'être terminées (après Loulou et Louloute font de la recherche, Loulou et Louloute dans le business !) et je compte bien être là pour te voir devenir l'homme accompli que tu mérites d'être.

Marina, le petit rayon de soleil express de l'équipe « MargoPique » ! Merci pour tes conseils, ton écoute et ton art de me remonter le moral lors de coups de blues passagers. Tu es une superbe scientifique et une femme incroyable. Je compte sur toi pour prendre soin du petit Binôme au laboratoire et pour qu'on se retrouve pour aller prendre un verre (ou deux) ! Marie-Lise, merci à toi pour toutes les discussions et les rires dans le bureau du troisième à Méchain. J'espère que vous avez une chambre en plus à Bordeaux parce qu'il se pourrait que je vienne y faire un tour (et je pense que Loulou sera aussi du voyage) ! Je tiens également à te remercier Florence. Ton regard scientifique, extérieur au monde HTLV, a toujours été très constructif et c'était un bonheur de te côtoyer au laboratoire, avec ta bonne humeur constante si appréciable.

Un grand Merci à toute l'équipe « MargoPique », avec qui j'ai vécu des moments inoubliables tout au long de ces années.

Merci à toi Damien, cette cohabitation dans notre QG en 217 a été formidable, marquée par de gros fous rires, beaucoup de chansons en tout genre et souvent improbables (je te remercie d'avoir ouvert mon répertoire !) ou des moments « fond du gouffre » ou « perte de cheveux » qui nous ont permis, avec le petit Binôme, de mener en parallèle une étude sur l'évolution psychologique d'un doctorant. J'espère que tu finiras en apothéose cette thèse et que tu trouveras ta voie (mais je n'en doute pas).

Merci Koko pour tes apparitions soudaines, ta bonne humeur et pour les aventures hors du laboratoire avec Damien. J'espère que l'on se retrouvera tous les trois autour d'une darkness !

Merci Ambroise. Il a fallu que l'on s'adapte et que l'on comprenne le mode de fonctionnement du Dr. Marcais (et de ses blagues) mais on a alors pu t'apprécier à ta juste valeur. Encore bravo pour ton poste et je compte sur toi pour porter haut les couleurs du HTLV-1 !

Merci à toi Laurence pour m'avoir initié à la Biologie moléculaire ainsi qu'aux apprentis chercheurs ! Merci aussi pour tes conseils. Je suis heureuse que tu t'épanouisses dans tes nouvelles responsabilités.

Merci Cecilia ! Tu as été une super copine de rire. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils et tes anecdotes toujours improbables et très drôles. On se retrouvera avec Maxime au Kabanito !

Enfin, merci à vous tous, membres de l'équipe des RétroQuiP, ce fut quatre belles années à vos côtés.

Au-delà de mon équipe, je tiens à remercier toutes les personnes appartenant aux différents groupes des bâtiments Méchain ou Roussy que j'ai pu côtoyer et avec lesquelles j'ai partagé ces années à l'Institut. Vous m'avez soutenu et êtes devenus pour beaucoup d'entre vous des amis.

Merci à Héloïse et Lucas pour votre présence, nos discussions, nos sorties, nos joggings (il y a eu du relâchement ces derniers temps !) et beaucoup d'autres choses. Vous allez me manquer mais heureusement vous ne partez pas très loin (je ne connais ni la Belgique ni Nantes ça tombe bien), ce qui nous permettra de nous voir !

Merci à toi Sonia, avec ton accent inimitable et ta bonne humeur. Je suis contente d'avoir partagé avec toi, Laura, Loulou et Lucas cette fin de thèse rocambolesque. Félicitation pour ton mariage qui clôturera magnifiquement cette année et j'espère que nous pourrons venir te voir cet été, peuchère (à défaut de mettre mon terme favori, peu approprié ici) !

Ursula, ma collègue, tu comptes parmi mes amis proches et c'était vraiment super de partager ce périple de quatre ans à tes côtés. Je te remercie d'avoir été là et je suis sûre que ça sera toujours le cas quand nous serons de vieilles rombières de 70 ans (en collocation à Montréal ou ailleurs dans le Monde qui sait)! Une nouvelle vie va bientôt s'ouvrir à toi et l'on pourra partager cela ensemble !

ευχαριστώ Kostas ! Ta bonne humeur, tes cours de langage et de danse grecques restent de grands moments. Peut-être que je viendrai mettre en pratique tout cela dans ton pays prochainement. En tout cas, il y a encore du travail !

Merci à toi Laura pour nos discussions, nos courses à pied, tes encouragements et tes conseils. Je suis persuadée que tu réussiras brillamment ton projet professionnel post-doctorat, en tout cas je serai là pour te soutenir.

Merci à Léa pour tous les bons moments au troisième de Méchain ainsi que lors des soirées Jecco ou autres (bien qu'il faille te « réserver » plusieurs semaines à l'avance pour cela). On veillera à ta santé avec Loulou pour ta dernière année de thèse !

Merci à tous les Jecco (Guillaume, Loïc B., Stan et beaucoup d'autres) pour ces moments de partage et de communion, qui ont été de vraies soupapes de décompression (je n'en dirai pas plus).

Merci à Maryline et Véronique, des gestionnaires de choc ! Votre aide et votre bonne humeur (ainsi que tes blagues Maryline) m'ont été précieuses pour affronter les méandres administratifs tout au long de ces années, particulièrement dans cette dernière ligne droite. Merci à vous et à Alexis (je vois à présent simply market sous un jour différent) pour les petits cafés/fous rires de midi que nous avons partagés ensemble, c'était du vrai bonheur !

Un grand Merci à Yann (mon dieu incontesté des WB), Romain, Milica (merci de m'avoir rendu addict aux marquages et pour ton aide), Anne-Sophie (merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et ton soutien), Samuel (merci de ne pas avoir contacté la police lorsque je rigolais !), Bernina (merci pour tes précieux conseils et ton soutien pour mon projet professionnel), Sandy, Matthieu, Haniaa, Daniela, Véro (peut-être qu'un jour on découvrira notre lien de parenté), Audrey, Khemwantee, Ahmed, Greg, Céline, Nico, Stéphane, Agathe et beaucoup d'autres. Vous avez tous participé à rendre ces quatre années formidables et inoubliables.

En dehors de l'Institut, je tiens particulièrement à remercier tous mes amis de Paris, de Clermont, de Vichy et d'ailleurs qui ont été présents tout au long de ces années de thèse, voir bien avant, et dont le soutien et l'amitié me sont indispensables.

Maxime, mon minis poing, notre rencontre a été un véritable coup de foudre (ton lancer de jambes en a été pour beaucoup). Tu es devenu un partenaire de danse fantastique, un confident et un conseiller hors pair, tout simplement un ami irremplaçable, qui tient une place importante et toute particulière. Ma vie serait bien moins joyeuse et pétillante sans toi et pour tout cela je t'en remercie. Vivement Miami et toutes nos aventures à venir ensemble !

Cécilia, ma Booty, merci d'être présente depuis notre rencontre en Master. Nous avons évolué ensemble au cours de ces années et une belle amitié s'est créée. Je suis pressée d'être là pour ton mariage avec Juju, la ribambelle d'enfants et les 60 prochaines années à venir !

Merci à toi Vi pour ton amitié à toute épreuve et ta présence précieuse. Tu seras une formidable maman à l'image de l'amie que tu es.

Merci Béné et Marie, mes Caribous, pour tous ces beaux moments passés ensemble et encore de nombreux en perspective !

Merci Chichi pour ton écoute, ta bonne humeur communicative, ta présence et ton soutien constant depuis que nous nous sommes rencontrés.

Merci à Adèle, Claire, Lina, PG, Jean-Phi, Thomas, Ninine d'être des amis fidèles ainsi que pour votre soutien malgré la distance ou les emplois du temps chargés.

Pour terminer, je voudrais adresser des remerciements particuliers et affectueux à mes parents, sans qui tout mon parcours pour arriver jusqu'à cette soutenance de thèse n'aurait pas été possible. Vous m'avez toujours soutenu dans mes décisions et vous avez veillé à ce que je sois dans les meilleures conditions possibles pour réussir, alors pour tout cela je vous en serai toujours infiniment reconnaissante. Vous êtes des parents extraordinaires, j'ai de la chance de vous avoir et de pouvoir compter sur vous. Merci !

Merci Zaza pour nos moments ensemble et nos rires. J'espère que tu comprendras que rien ne peut remplacer la famille et que ces liens sont précieux afin que nous en profitions davantage.

Merci Sapo pour nos excursions dans Paris, nos brunchs et nos discussions. Nous en avons parcouru du chemin depuis nos étés à Varennes ou à Venda ! Pourtant nous sommes toujours réunies et complices, je t'en remercie.

Enfin, un grand Merci à l'ensemble de ma famille qui est tout simplement incroyable et a toujours été présente au cours des années, dans la joie et la bonne humeur qui les caractérisent !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	11
ABRÉVIATIONS	17
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX.....	25
Avant-propos	29
INTRODUCTION.....	35
I. L'INFECTION PAR HTLV-1 : CARACTÉRISTIQUES D'UN RÉTROVIRUS ATYPIQUE.....	37
I.1. Phylogénie du HTLV-1 et des PTLV associés	39
I.2. Epidémiologie du HTLV-1	45
I.2.1. <i>Epidémiologie descriptive</i>	45
I.2.2. <i>Epidémiologie moléculaire</i>	47
I.3. La transmission des virus HTLV	51
I.4. Détection et prévention de l'infection par HTLV	55
I.4.1. <i>Moyens diagnostiques</i>	55
I.4.2. <i>Prévention de l'infection</i>	59
II. LES MÉCANISMES INFECTIEUX DU HTLV-1 : DES STRATÉGIES REDOUTABLES POUR PERSISTER ET ÉCHAPPER AU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	63
II.1. La particule virale HTLV-1	65
II.1.1. <i>Morphologie du virion</i>	65
II.1.2. <i>Génome viral et synthèse des protéines d'HTLV-1</i>	67
a) Synthèse des protéines de structure et des enzymes virales	69
b) Synthèse des protéines régulatrices et auxiliaires.....	71
c) Synthèse de transcrits antisens	73
II.2. Les étapes cellulaires clés de l'infection par HTLV-1.....	75
II.2.1. <i>Cellules cibles du virus</i>	75

II.2.2.	<i>Cycle de multiplication du HTLV-1</i>	81
a)	La phase précoce du cycle viral.....	81
b)	La phase tardive du cycle viral	85
II.2.3.	<i>Stratégies d'échappement au système immunitaire</i>	91
a)	La transmission cellule-cellule du HTLV-1	91
b)	La multiplication clonale	97
c)	La répression de l'expression virale	99
II.3.	Les pathologies liées à l'infection par HTLV-1	105
II.3.1.	<i>Leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL)</i>	105
a)	Tableau clinique	105
b)	Pathogénèse	111
c)	Traitements	113
II.3.2.	<i>Paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1</i> <i>(TSP/HAM)</i>	117
a)	Tableau clinique	117
b)	Pathogénèse	121
c)	Traitements	125
II.3.3.	<i>Autres pathologies associées à HTLV-1</i>	127
III.	TAX DU VIRUS HTLV-1: UNE PROTÉINE MODIFIÉE AUX EFFETS PLÉIOTROPES CENTRAUX DANS LE PROCESSUS ONCOGÈNE	131
III.1.	La diversité de l'interactome Tax participe à son pouvoir oncogène dans les cellules	133
III.1.1.	<i>Tax active de nombreuses voies de signalisation cellulaires</i>	133
a)	Tax et la voie NF- κ B	133
b)	Tax et la voie PI3K-Akt.....	143
c)	Tax et la voie MAPK.....	145
III.1.2.	<i>Tax détourne des acteurs cellulaires impliqués dans des processus biologiques clés</i>	149

a)	Tax cible les acteurs de la transcription favorisant l'expression de gènes viraux et cellulaires	149
b)	Tax cible les acteurs du cycle cellulaire et de l'apoptose favorisant l'immortalisation des cellules.....	153
c)	Tax cible les acteurs du maintien de l'intégrité génomique favorisant la transformation des cellules.....	161
III.2.	Les caractéristiques structurelles et la localisation de Tax sont adaptées à ses fonctions	165
III.2.1.	<i>Localisation subcellulaire de la protéine Tax</i>	165
III.2.2.	<i>Structure de la protéine Tax</i>	169
III.3.	Les modifications post-traductionnelles de Tax déterminent sa localisation et ses fonctions	173
III.3.1.	<i>L'ubiquitinylation de Tax</i>	177
a)	Description du processus d'ubiquitinylation des protéines	177
b)	L'ubiquitinylation de Tax et son implication dans l'activation de la voie NF- κ B	181
III.3.2.	<i>La SUMOylation de Tax</i>	189
a)	Description du processus de SUMOylation des protéines.....	189
b)	La SUMOylation de Tax et son implication dans l'activation de la voie NF- κ B	195
IV.	LE RÔLE DES MACHINERIES DE SUMOYLATION ET D'UBIQUITINYLATION DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB : NOUVELLES PROBLÉMATIQUES.....	199
IV.1.	Modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B induite par la protéine Tax	201
IV.2.	Problématiques abordées.....	205
IV.2.1.	<i>Rôle de la SUMOylation de Tax dans l'étape nucléaire de l'activation de la voie NF-κB</i>	207

IV.2.2. <i>Décryptage du mécanisme de recrutement et d'activation du complexe IKK</i>	
<i>par Tax via l'identification de son ubiquitine ligase.....</i>	207
MATÉRIEL ET MÉTHODES	213
I. MATÉRIEL.....	215
I.1. Cellules.....	217
I.2. Plasmides et siARN.....	219
I.3. Anticorps	221
II. MÉTHODES.....	223
II.1. Transfection transitoire	225
II.2. Purification de protéine sur billes de nickel.....	227
II.3. Co-immunoprécipitation	227
II.4. Immunoblot et quantification.....	229
II.5. Immunofluorescence.....	231
II.5.1. <i>Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine Tax</i>	231
II.5.2. <i>Etude de la translocation nucléaire de la protéine RelA.....</i>	233
II.6. Transactivation de promoteur	235
II.7. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	237
RÉSULTATS	241
I. LA SUMOYLATION DE TAX : UN ÉVÉNEMENT NON ESSENTIEL POUR	
L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB.....	243
I.1. Le blocage d'Ubc9, une stratégie efficace pour inhiber la SUMOylation de Tax	
et la machinerie de SUMOylation endogène.....	245
I.2. Une protéine Tax non SUMOylée active la transcription dépendante de NF- κ B..	249
I.2.1. <i>Analyse de l'activation de promoteur transfecté dépendant de NF-κB</i>	
<i>lors du blocage d'Ubc9</i>	249
I.2.2. <i>Analyse de l'activation de promoteur intégré dépendant de NF-κB</i>	
<i>lors du blocage d'Ubc9</i>	253

I.3. Une protéine Tax non SUMOylée induit l'expression de gène endogène dépendant de NF- κ B	255
I.4. Une protéine Tax non SUMOylée active la transcription dépendante de NF- κ B dans les cellules T	259
II. LA PROTÉINE TRAF5 : NOUVEAU RÔLE DANS L'UBIQUITINYLATION DE TAX ET DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB	265
II.1. TRAF5 contribue à l'ubiquitinylation de la protéine Tax, indépendamment de son activité ligase	267
II.2. TRAF5 est impliquée dans l'activation de la transcription dépendante de NF- κ B, indépendamment de son activité ligase	271
II.3. TRAF5 induit la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , indépendamment de son activité ligase	275
II.3.1. <i>Analyse du recrutement et de l'activation du complexe IKK par Tax lors du blocage de l'expression de TRAF5</i>	<i>275</i>
II.3.2. <i>Analyse du recrutement et de l'activation du complexe IKK par Tax lors du blocage de l'activité de TRAF5.....</i>	<i>283</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	291
I. BILAN DES RECHERCHES	293
II. LA SUMOYLATION DE TAX ET L'ACTIVATION NF-κB : DES RÉPONSES A L'ORIGINE DE NOUVELLES PROBLÉMATIQUES	297
II.1. Quel rôle pour la SUMOylation de Tax ?.....	299
II.2. La place d'Ubc9 dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax	301
II.3. La SUMOylation des protéines cellulaires est-elle impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B ?	303
III. L'ASSOCIATION DU COMPLEXE TAX/IKK : UN NOUVEAU MÉCANISME A COMPLÉTER.....	305
III.1. Un mécanisme à deux étapes, fonctionnant ensemble pour l'activation optimale du complexe IKK	309

III.2. Des interrogations persistent autour de la phosphorylation d'IKK α/β et de leur recrutement induit par TRAF5	311
III.3. Quelles sont les enzymes E2 et E3 associées à TRAF5 ?	313
III.4. L'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B, un élément à prendre en compte dans nos analyses	317
IV. CONCLUSION.....	321
BIBLIOGRAPHIE	323
ANNEXES	377

ABRÉVIATIONS

A

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
APH-3	<i>Antisense Protein of HTLV-3</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G</i>
APP	<i>ATL Prevention Program</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate

B

BAFF	<i>B-cell Activating Factor</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>
BRCA-1	<i>Breast Cancer-1</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bZIP	<i>basic-region leucine Zipper</i>

C

CADM1	<i>Cell Adhesion Molecule 1</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCR4	<i>CC chemokine Receptor 4</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
c-FLIP	<i>cellular FLICE-Like Inhibitory Protein</i>
c-IAP1/2	<i>cellular-Inhibitors of Apoptosis 1 and 2</i>
CMV	Cytomégalovirus

Co-IP	Co-Immunoprécipitation
CRE	<i>cAMP Response Element</i>
CREB/ATF	<i>cAMP Response Element Binding protein/Activating Transcription Factor</i>
CRM1	<i>Chromosome Region Maintenance interacting protein 1</i>
CTD	<i>C-Terminal Domain</i>

D

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC-SIGN	<i>DC-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DN	<i>Dominant Negative</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>

E, F, G

EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAB	<i>GRB2-Associated Binding protein</i>
GLUT1	<i>Glucose Transporter 1</i>
GRB2	<i>Growth factor Receptor-Bound protein 2</i>

H

HA	<i>Influenza Hemagglutinin</i>
HAID	<i>HTLV-1-Associated Infective Dermatitis</i>
HBS	<i>Hepes Buffered Saline 2X</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HBZ	<i>HTLV-1 Basic leucine Zipper factor or HTLV-1 bZIP factor</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HECT	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>

HeLa	Henrietta Lacks
HHV8/KSHV	<i>Human Herpesvirus type 8/Kaposi's Sarcoma Herpesvirus</i>
HIV-1/2	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1 or 2</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
hnRNPA1	<i>heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>
HSV-2	<i>Herpes Simplex Virus type 2</i>
hTERT	<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
HTLV-1	<i>Human T-cell Leukemia Virus type 1</i>

I

IAP	<i>Inhibitors of Apoptosis Proteins</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IFNAR	<i>IFN-Alpha/beta Receptor</i>
IGC	<i>Interchromatin Granule Clusters</i>
IKK	<i>IκB Kinase</i>
INNO-LIA	<i>Innogenetics Line Immunoassay</i>
IRF9	<i>IFN Regulatory Factor 9</i>
ISG3	<i>IFN Stimulated Gene Factor 3</i>
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>

J, L

JAK1	<i>Janus Kinase 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
LKB1	<i>Liver kidney Kinase B1</i>
LMP1	<i>Latent Membrane Protein 1</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
LUBAC	<i>Linear Ubiquitin chain Assembly Complex</i>

M

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCM2-7	<i>Mini-Chromosome Maintenance proteins 2-7</i>
MCV	<i>Merkel Cell polyomavirus</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA-damage Checkpoint 1</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MTOC	<i>Microtubule-Organizing Center</i>
mTOR	<i>mechanistic Target Of Rapamycin</i>

N, O

NEMO/IKKγ	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
NHP	<i>Non-Human Primates</i>
NIK	<i>NF-κB-Inducing Kinase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NRP	<i>NEMO-Related Protein</i>
NRP-1	<i>Neuropilin-1</i>
NS	<i>Nuclear Speckles</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>

P

p30RE	<i>p30 mRNA-Responsive Element</i>
PBM	<i>PDZ Binding Motif</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PCAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PDK1	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>
PDLIM2	<i>PDZ and LIM domain protein 2</i>
PDZ	<i>PSD-95/Dlg/ZO-1</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
PIC	<i>Pre-Integration Complex</i>
PIN1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
pRB	<i>Retinoblastoma protein</i>
PRR	<i>Proline Rich Region</i>
P-TEFb	<i>Positive-Transcription Elongation Factor b</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PTLV	<i>Primate T-cell Lymphotropic Virus</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>

R

RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i>
RBD	<i>RNA Binding Domains</i>
RexBD	<i>Rex-Binding Domain</i>
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RNF4	<i>RING Finger protein 4</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RxRE	<i>Rex Responsive Element</i>

S

SCF-β-TrCP	<i>Skp1-Cullin-F-box-β-Transducin repeat-Containing Protein</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SENP	<i>Sentrin/SUMO-specific Protease</i>
siARN	<i>“small interfering” ARN</i>
SIM	<i>SUMO-Interacting Motif</i>
SOCS1	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 1</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
STAMBPL1	<i>STAM-Binding Protein-Like 1</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STLV	<i>Simian T-cell Lymphotropic Virus</i>
SU	<i>Surface Unit</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
SWI/SNF	<i>Switch/Sucrose Non Fermentable</i>

T

TAD	<i>Transactivating Domain</i>
TAFII28	<i>TBP-Associated Factor II 28</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-Activated Kinase 1</i>
TAL1	<i>T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1</i>
Tax	<i>Transcriptional Activator of pX region</i>
TBP	<i>TATAA-Binding Protein</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TK	<i>Thymidine Kinase</i>
TM	<i>Transmembrane unit</i>
TORC	<i>Transducer Of Regulated CREB activity</i>
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TRE	<i>Tax-Responsive Element</i>
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
TSLS	<i>Tax Speckled structure Localization Signal</i>
TSP/HAM	<i>Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy</i>

TSS	<i>Tax-Speckled Structures</i>
TWEAK	<i>TNF-like Weak inducer of apoptosis</i>

U, V, W

UBC domain	<i>UBiquitin-Conjugating domain</i>
Ubc	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>
Ubc9/UBE2I	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme 9/Ubiquitin-conjugating enzyme E2I</i>
Ubl	<i>Ubiquitin-like proteins</i>
VLP	<i>Virus-Like Particles</i>
VSV-G	<i>Vesicular Stomatitis Virus-G</i>
WB	<i>Western Blot</i>
Wip1	<i>Wild-type p53-induced phosphatase 1</i>

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

➤ INTRODUCTION

FIGURE 1: L'organisation phylogénétique des virus PTLV	38
FIGURE 2: Distribution géographique de l'infection par HTLV-1 dans le monde	44
FIGURE 3: Répartition géographique et dissémination des différents sous-types moléculaires d'HTLV-1	48
FIGURE 4: Les principaux modes de transmission des virus HTLV	52
FIGURE 5: Evolution de l'analyse morphologique des virions HTLV-1 par microscopie... ..	64
FIGURE 6: Structure de la particule virale HTLV-1	64
FIGURE 7: Organisation génomique du virus HTLV-1	66
FIGURE 8: Clivages des précurseurs polyprotéiques à l'origine des protéines de structure et des enzymes virales	68
FIGURE 9: Rôles des protéines Tax et HBZ dans l'histoire naturelle de l'infection par HTLV-1 conduisant au développement de l'ATLL	72
FIGURE 10: Comparaison de l'organisation génomique des virus HTLV-1 et HTLV-2.....	74
FIGURE 11: Taux d'infection par HTLV-1 des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺	76
FIGURE 12: Cycle de multiplication viral du HTLV-1, commun aux rétrovirus	80
FIGURE 13: La coopération entre HSPG, NRP-1 et GLUT1 induit l'entrée du virus HTLV-1 dans les cellules cibles, via leurs interactions avec la sous-unité SU virale.....	82
FIGURE 14: Le mécanisme de la transcription inverse chez les rétrovirus	84
FIGURE 15: Export des ARNm non épissés ou monoépissés viraux par la protéine Rex.....	86
FIGURE 16: Réorganisation structurelle des particules HTLV-1 lors de leur maturation.....	88
FIGURE 17: Les différents modèles de transmission cellule-cellule du virus HTLV-1	90
FIGURE 18: La synapse virologique chez les rétrovirus.....	92
FIGURE 19: Structure de la synapse virologique induite par l'infection HTLV-1	92
FIGURE 20: Bourgeonnement et libération des virions HTLV-1 au niveau de la fente synaptique	94

FIGURE 21: Mise en évidence de biofilms HTLV-1 à la surface de lymphocytes T CD4 ⁺ infectés.....	94
FIGURE 22: Modèle d'expansion clonale des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ pouvant conduire au développement de pathologies, comme l'ATLL	96
FIGURE 23: Fonction répressive de la protéine auxiliaire p30 sur l'expression du génome HTLV-1	98
FIGURE 24: Fonction répressive de la protéine auxiliaire p13 sur l'expression du génome HTLV-1	100
FIGURE 25: Inhibition de la voie de signalisation des IFN-I par le virus HTLV-1	104
TABLEAU 1: Maladies associées à HTLV-1	106
FIGURE 26: Cellules leucémiques en « fleur ».....	106
TABLEAU 2: Les différentes formes cliniques d'ATLL et leurs caractéristiques.....	106
FIGURE 27: Modèle de développement de l'ATLL associé à HTLV-1	110
FIGURE 28: Les infiltrations inflammatoires provoquent des atrophies de la moelle épinière et des lésions dans le cerveau, chez les malades atteints de TSP/HAM.....	118
FIGURE 29: Modèle de l'origine des lésions inflammatoires au niveau du système nerveux central des patients atteints de TSP/HAM.....	120
FIGURE 30: Mécanismes viraux de déstabilisation de la barrière hématoencéphalique	122
FIGURE 31: Modèle de développement de la TSP/HAM associée à HTLV-1	124
FIGURE 32: Structure des facteurs NF-κB et de leurs inhibiteurs IκB	132
FIGURE 33: Les voies NF-κB canonique et non canonique	134
FIGURE 34: Activation des voies NF-κB par les protéines Tax1 et Tax2.....	138
FIGURE 35: La voie PI3K-Akt et son activation par la protéine Tax.....	142
FIGURE 36: La voie MAPK et son activation par la protéine Tax	144
FIGURE 37: Modèle d'activation de la transcription virale induite par Tax au niveau des LTR proviraux.....	148
FIGURE 38: La protéine Tax dérégule différents acteurs contrôlant la transition G1/S du cycle cellulaire.....	154
FIGURE 39: La protéine Tax dérégule différents acteurs médiant l'apoptose.....	156

FIGURE 40: La protéine Tax dérégule le point de contrôle de la transition G2/M, favorisant l'accumulation des anomalies génomiques	160
FIGURE 41: Modèle des différents événements et dérégulations induites par Tax conduisant à l'immortalisation et à la transformation des cellules infectées par HTLV-1 ...	164
FIGURE 42: La protéine Tax est localisée dans des granules cytoplasmiques et dans des compartiments périnucléaires	166
FIGURE 43: La protéine Tax est localisée dans des corps nucléaires spécifiques.....	166
FIGURE 44: Structure de la protéine Tax.....	170
FIGURE 45: Les modifications post-traductionnelles de Tax	174
FIGURE 46: Le processus d'ubiquitinylation des protéines.....	176
FIGURE 47: Représentations de l'ubiquitine et des différentes ubiquitinylations possibles du substrat.....	180
FIGURE 48: Rôle de l'ubiquitinylation de Tax dans sa localisation et dans l'activation de la voie NF- κ B	182
FIGURE 49: Comparaison de séquences entre les protéines SUMO et ubiquitine	188
FIGURE 50: Le processus de SUMOylation des protéines	190
FIGURE 51: Modèle d'activation de la voie NF- κ B canonique induite par Tax	200
FIGURE 52: Structure des protéines TRAF.	208

➤ MATÉRIEL ET MÉTHODES

TABLEAU 3: Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans nos travaux	220
---	-----

➤ RÉSULTATS

FIGURE 53: La SUMOylation endogène de Tax est fortement et spécifiquement diminuée par le blocage d'Ubc9.....	244
FIGURE 54: Le processus de SUMOylation endogène des protéines est fortement réduit par le blocage d'Ubc9	248
FIGURE 55: Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κ B transfectés	250

FIGURE 56: Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κ B intégrés.....	252
FIGURE 57: Une protéine Tax non SUMOylée induit l'expression du gène endogène ICAM-1 dépendant de NF- κ B.....	254
FIGURE 58: Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κ B transfectés dans les cellules T.....	258
FIGURE 59: La protéine TRAF5 participe à l'ubiquitinylation de Tax, notamment par des chaînes d'ubiquitine de type K63.....	266
FIGURE 60: L'activité ligase de la protéine TRAF5 n'est pas impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax.....	268
FIGURE 61: La protéine TRAF5 contribue à l'activation de promoteur à éléments de réponse κ B par Tax, indépendamment de son activité ligase.....	272
FIGURE 62: Contrairement à l'association Tax/NEMO, le recrutement des formes phosphorylées d'IKK α et β par Tax nécessite la protéine TRAF5.....	276
FIGURE 63: La protéine TRAF5 est impliquée dans le recrutement d'IKK α par Tax mais pas dans sa phosphorylation.....	280
FIGURE 64: La protéine TRAF5 est impliquée dans le recrutement d'IKK β par Tax mais pas dans sa phosphorylation.....	282
FIGURE 65: L'activité ligase de TRAF5 n'est impliquée ni dans le recrutement d'IKK α et β par Tax, ni dans la phosphorylation de ces sous-unités.....	284

➤ DISCUSSION ET PERSPECTIVES

FIGURE 66: Ubc9 pourrait réprimer l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax en favorisant son transport dans les corps nucléaires.....	302
FIGURE 67: Nouveau modèle de formation du complexe Tax/IKK proposé, faisant intervenir deux étapes dont l'une est dépendante de TRAF5.....	304
FIGURE 68: L'inhibition de l'expression de TRAF5 ne diminue pas la colocalisation de Tax et NEMO dans le compartiment périnucléaire.....	306
FIGURE 69: L'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B s'accroît au cours du temps et peut biaiser nos analyses.....	316

Avant-propos

Les virus sont des agents infectieux complexes, qui ont développé des stratégies d'adaptation ingénieuses leur permettant d'infecter, de proliférer et de survivre dans une grande variété d'organismes vivants.

Chez l'homme, les virus se sont plus ou moins bien adaptés à leur hôte et sont responsables de différentes pathologies qui peuvent-être graves, voir fatales. Les virus ont notamment été mis en évidence comme étant responsables de cancers. Cette notion de virus oncogènes chez l'homme a longtemps été débattue (Javier and Butel, 2008) car le lien de causalité entre un virus donné et un cancer humain peut-être difficile à démontrer, du fait de la présence souvent ubiquitaire des virus suspectés d'être associés à un cancer, ou encore en raison de la faible proportion de personnes infectées qui développent à terme le cancer suspecté.

Ce n'est donc qu'au début du XXème siècle que les premières études démontrant la relation entre infections virales et cancers sont apparues. La découverte en 1911 par Peyton Rous du premier virus oncogène, le virus du Sarcome de Rous (RSV, *Rous Sarcoma Virus*), responsable de tumeurs chez le poulet, constitue l'un des travaux phares de cette époque (Rous, 1911). D'autres virus induisant des cancers ont été identifiés dans les années suivantes, dont le premier virus oncogène humain, le virus d'Epstein-Barr (EBV, *Epstein-Barr Virus*), découvert en 1965 par l'équipe de Tony Epstein et d'Yvonne Barr, comme étant l'agent responsable du développement de lymphomes de Burkitt (Epstein et al., 1965). Ces découvertes constituèrent un véritable tournant dans la reconnaissance des virus comme potentielle cause de cancers.

Ce n'est qu'en 1980 que l'équipe de Robert Gallo découvrit le premier rétrovirus oncogène humain, le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1, *Human T-cell Leukemia Virus type 1*), grâce à la détection d'une activité de transcriptase inverse ainsi qu'à la visualisation de particules virales bourgeonnantes ou extracellulaires, dans des cultures de lymphocytes issus d'un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T (s'avérant plus tard être en réalité une leucémie à cellules T de l'adulte) (Poiesz et al., 1980). Toutefois, l'identification du virus HTLV-1 comme agent étiologique de la leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL, *Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*), découverte en 1977 au Japon par Kiyoshi Takatsuki et ses collègues (Uchiyama et al., 1977), ne fut établie qu'un an plus tard par l'équipe d'Isao Miyoshi (Hinuma et al., 1981).

D'après les dernières études, entre 15 et 20% des cancers dans le Monde sont dus à des infections virales, soit plus de 1,9 millions de cas recensés chaque année (Morales-Sánchez and Fuentes-Pananá, 2014; Parkin, 2006). Par ailleurs, ces études montrent également qu'il existe six virus oncogènes humains différents : le virus d'Epstein-Barr (EBV), les virus de l'Hépatite B (HBV, *Hepatitis B Virus*) et de l'Hépatite C (HCV, *Hepatitis C Virus*), le Papillomavirus humain (HPV, *Human Papillomavirus*), le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) et l'Herpèsvirus humain de type 8 ou Herpèsvirus lié au Sarcome de Kaposi (HHV8, *Human Herpesvirus type 8* ou KSHV, *Kaposi's Sarcoma Herpesvirus*).

Récemment, les virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 et 2 (HIV-1/2, *Human Immunodeficiency Virus type 1 or 2*), ainsi que le virus des carcinomes à cellules de Merkel (MCV, *Merkel Cell polyomavirus*) ont été associés au développement de cancers chez l'homme, de façon indirecte pour le premier et directe pour le second (Feng et al., 2008; Grulich et al., 2007).

L'étude de ces virus oncogènes a permis de décrypter les mécanismes cellulaires impliqués dans l'immortalisation et la transformation des cellules, que l'on retrouve dans l'ensemble des cancers humains, définissant ainsi les bases de la carcinogénèse. Les virus oncogènes ont notamment permis la découverte des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRB (*Retinoblastoma*) ou encore, celle des oncogènes cellulaires et viraux (Javier and Butel, 2008; Morales-Sánchez and Fuentes-Pananá, 2014). Encore de nos jours, l'analyse de ces virus et de leurs modes d'action sont des outils précieux qui contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes tumorigènes, ainsi qu'à l'élaboration de stratégies préventives et thérapeutiques contre différents types de cancers, d'origine ou non virale.

Dans cette optique d'amélioration de la caractérisation des mécanismes tumorigènes viraux, nous nous intéressons au laboratoire au rétrovirus HTLV-1, et plus particulièrement à sa protéine Tax, principale responsable du pouvoir oncogène de ce virus (Chlichlia and Khazaie, 2010; Tanaka et al., 1990). En effet, Tax met en œuvre différentes stratégies pour déréguler de nombreux acteurs impliqués dans les voies cellulaires contrôlant la prolifération, la survie ou encore l'intégrité génomique des cellules. Dans notre équipe, nous étudions spécifiquement la dérégulation de la voie NF- κ B induite par la protéine Tax, qui est une étape clef du processus oncogène dans l'infection par HTLV-1, conduisant à terme au développement de l'ATLL, une lymphoprolifération maligne mortelle qui sera décrite en détail dans la partie II.3.1.

Notre laboratoire ainsi que d'autres équipes ont exploré l'importance des modifications post-traductionnelles de Tax, notamment de sa SUMOylation et de son ubiquitylation, dans l'activation constitutive de la voie NF- κ B (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006).

Les travaux exposés dans ce manuscrit développent de nouvelles approches permettant d'analyser plus précisément l'implication de ces deux modifications post-traductionnelles de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, ainsi que leurs mécanismes d'action, pour lesquels de nombreuses zones d'ombre restent à éclaircir.



Introduction



I. L'INFECTION PAR HTLV-1 : CARACTÉRISTIQUES D'UN RÉTROVIRUS ATYPIQUE

Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1, *Human T-cell Leukemia Virus type 1*) appartient à la même famille virale que le virus de l'Immunodéficience humaine. Toutefois, l'infection par HTLV-1 possède des caractéristiques qui lui sont propres, notamment au niveau épidémiologique et plus particulièrement, en ce qui concerne sa distribution géographique. En effet, le HTLV-1 n'est pas un virus ubiquitaire puisqu'il existe des zones de forte endémie HTLV-1, avec plus de 2% de séroprévalence dans la population adulte, souvent situées près de zones d'endémie plus faible (Gessain, 2011). Par ailleurs, l'infection par HTLV-1 se caractérise également par l'augmentation progressive de la séroprévalence avec l'âge, surtout chez les femmes après 30-40 ans, dans les zones de forte endémie (Goncalves et al., 2010).

La détection et la prévention de l'infection par le virus T lymphotrope humain de type 1, particulièrement dans ces régions endémiques, représentent un véritable enjeu de santé publique puisque, selon le sexe, l'âge, le groupe ethnique et l'origine géographique, de 0,5 à 50% des sujets dans ces régions, possèdent des anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes viraux d'HTLV-1 (Gessain, 2011).

Les études épidémiologiques contribuent au développement de ces stratégies de détection et de prévention, limitant ainsi la propagation du HTLV-1 dans le monde. Ces analyses permettent, en outre, de mieux comprendre cette infection virale ainsi que son origine.

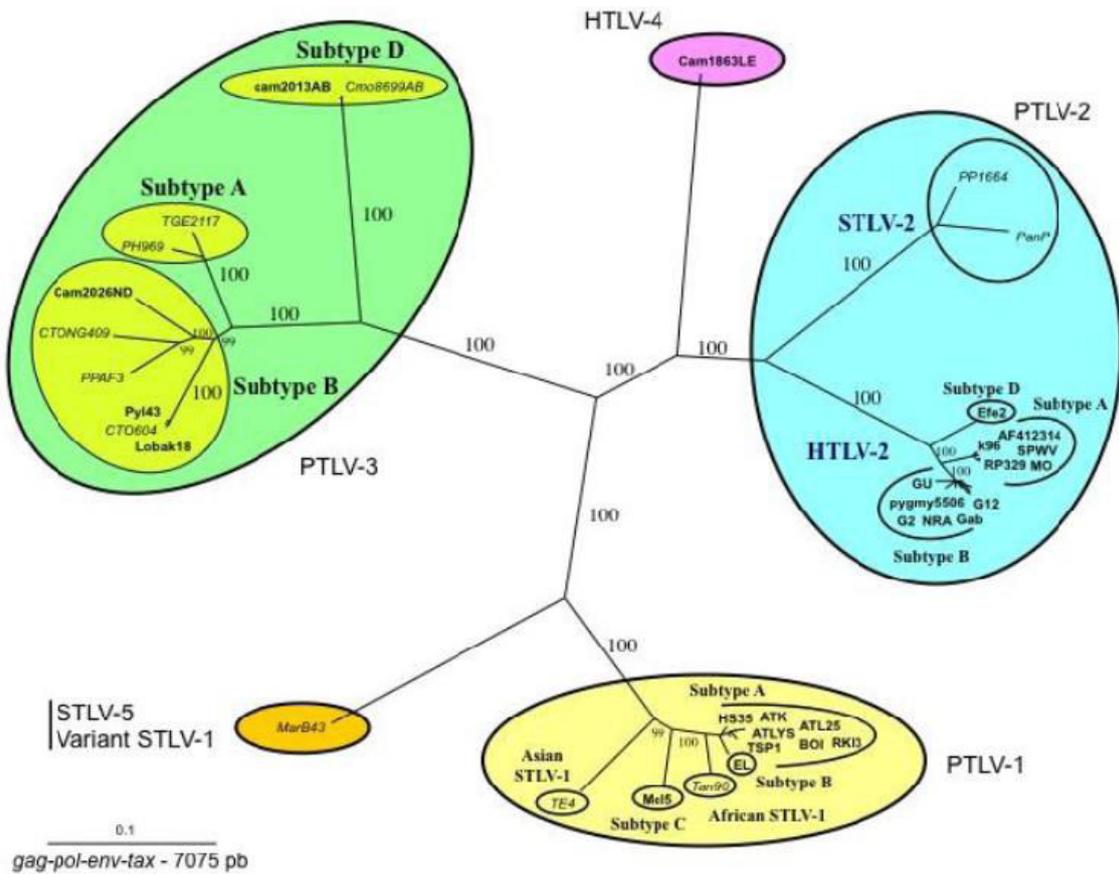


FIGURE 1 : L'organisation phylogénétique des virus PTLV.

Cet arbre a été construit à partir de l'analyse phylogénétique des séquences concatémériques des gènes *gag-pol-env-tax*, provenant de chacun des génomes de PTLV répertoriés dans GenBank. Les quatre différents groupes viraux, PTLV-1, PTLV-2, PTLV-3 et PTLV-4 sont représentés en fonction de l'évolution de leurs séquences au cours du temps. Les souches humaines (HTLV) sont en gras. La souche Mac B43 provient de macaques élevés en captivité (Van Dooren et al., 2005) et possède un génome très divergent de ceux des virus PTLV-1 isolés, ce qui explique sa position dans l'arbre. De nombreux chercheurs considèrent cette souche, baptisée STLV-5, comme une nouvelle souche simienne distincte des PTLV-1 (Liégeois et al., 2008). D'après (Mahieux and Gessain, 2011).

I.1. Phylogénie du HTLV-1 et des PTLV associés

Selon la classification officielle des virus, établie chaque année par le Comité ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), le HTLV-1 appartient à la famille des *Retroviridae*, et plus précisément à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Sa caractérisation en tant que rétrovirus s'explique notamment par la transcription inverse de son génome ARN en ADN, qui peut ensuite être intégré dans la chromatine des cellules infectées.

En 1998, les virus HTLV furent classés dans le genre des *Deltaretrovirus* (Pringle, 1998), qui regroupe également les virus T lymphotropes simiens (STLV, *Simian T-cell Lymphotropic Virus*), l'équivalent du HTLV chez le singe, ainsi que le virus de la leucémie bovine (BLV, *Bovine Leukemia Virus*). Le virus BLV, découvert et caractérisé dans les années 1970 (Gilden et al., 1975; Miller et al., 1969), a de nombreux points communs avec les virus HTLV et STLV, expliquant leur regroupement au sein d'un même genre. Ces trois virus possèdent notamment une organisation génomique similaire, avec une région pX caractéristique en 3' codant, entre autre, pour la protéine Tax (Rosen et al., 1986).

Les fortes ressemblances entre les virus BLV et HTLV-1, qui induisent tous les deux des leucémies chez leurs hôtes (des leucémies à cellules B pour le BLV et à cellules T pour le HTLV-1), expliquent l'utilisation du BLV comme modèle d'étude de l'infection *in vivo*, permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes pathogènes et de persistance virale mis en place par HTLV-1 chez l'homme (Gillet et al., 2007; Rodríguez et al., 2011).

La comparaison des séquences répétées terminales (LTR, *Long Terminal Repeat*) des virus HTLV-1 et STLV indique que ces deux rétrovirus sont très proches, puisqu'il existe de 90 à 95% d'homologies entre leurs séquences LTR (Watanabe et al., 1986). Du fait de cette proximité, les virus T lymphotropes humains et simiens ont été regroupés sous le nom de virus T lymphotropes des primates (PTLV, *Primate T-cell Lymphotropic Virus*) (Gessain and de Thé, 1996; Watanabe et al., 1986).

L'analyse des gènes gag, pol, env et tax de l'ensemble des génomes de PTLV répertoriés dans les banques de séquences a permis de définir quatre groupes viraux distincts : PTLV-1, PTLV-2, PTLV-3 et PTLV-4 (**FIGURE 1**) (Mahieux and Gessain, 2011).

Les PTLV-1 regroupent les virus HTLV-1 ainsi que les virus STLV-1 (**FIGURE 1**), qui ont été isolés au Japon en 1982 dans des sera de macaques puis, par la suite, dans de nombreuses espèces de singes d'Asie et d'Afrique (Gessain and Mahieux, 2000; Miyoshi et al., 1982).

L'analyse des séquences de la protéine d'enveloppe gp21 des STLV-1 de chimpanzés issus de la République Démocratique du Congo et des HTLV-1 présents chez des habitants de la même région, a montré une quasi-identité entre ces séquences (97/98%), appuyant la thèse d'une origine simienne du HTLV-1, à partir de la transmission du virus STLV-1 des singes aux hommes (Koralnik et al., 1994). Cette transmission doit se faire principalement par passage de sang contenant des lymphocytes infectés, correspondant au principal mode de contamination chez l'homme. Le contact infectant, qui est probablement un événement assez rare dans la nature, peut avoir lieu de différentes façons, comme par exemple durant la chasse. En effet, la consommation de « viande de brousse » est encore à l'heure actuelle très répandue dans de nombreux pays d'Afrique centrale, entraînant une potentielle transmission du virus à l'homme, lors de morsures profondes par un animal infecté ou lors de coupures accidentelles au cours du dépeçage (Filippone et al., 2015; Kazanji et al., 2015).

Malgré leur proximité, les virus HTLV-1 et STLV-1 se distinguent au niveau pathologique. L'infection par HTLV-1 peut en effet induire le développement de leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL, *Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*) ou de maladies inflammatoires correspondant à la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM, *Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy*) (description détaillée de ces pathologies à la partie II.3.). A l'inverse, seulement une dizaine de cas de leucémies ou de lymphomes T similaires aux ATLL (avec en particulier une intégration clonale du provirus dans les cellules tumorales) ont été décrits chez plusieurs espèces de singes infectés par le virus STLV-1, alors qu'aucun cas de neuromyélopathies correspondant à la TSP/HAM n'a été rapporté (Gessain, 2011).

Le groupe des PTLV-2, bien distinct des PTLV-1, correspond aux virus HTLV-2 et à leurs équivalents simiens, les STLV-2 (**FIGURE 1**), qui ont été découverts chez des bonobos dans les années 1990 (Giri et al., 1994; Liu et al., 1994) et qui n'ont, pour l'instant, pas été identifiés chez d'autres espèces de singes, contrairement aux STLV-1. L'identité de séquence entre les génomes d'HTLV-2 et de STLV-2 est d'environ 75%, ce qui est beaucoup moins important que pour les HTLV-1/STLV-1 (Van Brussel et al., 1998).

A l'inverse des PTLV-1, les PTLV-2 sont peu pathogènes bien qu'ils soient capables de transformer des lymphocytes T *in vitro*. L'absence d'activation constitutive de la voie Jak/STAT dans les cellules infectées par les PTLV-2, et qui a lieu lors de l'infection par des PTLV-1, est une des nombreuses hypothèses avancées pour expliquer cette différence de pathogénicité (Mulloy et al., 1998a).

En ce qui concerne les PTLV-3, qui rassemblent les virus HTLV-3 et STLV-3, dont les génomes sont quasi-identiques (de 87 à 99% d'identités) (**FIGURE 1**), leurs séquences ne présentent que 60 à 62% d'homologies avec HTLV-1 ou HTLV-2, expliquant qu'ils forment un groupe phylogénétique distinct des autres PTLV (Calattini et al., 2006; Meertens et al., 2002).

Le STLV-3 a été identifié pour la première fois en 1994 chez un babouin hamadryas africain, maintenu en captivité (Goubau et al., 1994). D'autres souches ont ensuite été découvertes chez différentes espèces de singes originaires d'Afrique centrale, de l'Est et de l'Ouest (Mahieux and Gessain, 2011). Les deux premières souches d'HTLV-3 furent découvertes en 2005 chez deux individus asymptomatiques, vivants en forêt au Cameroun (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). Plus récemment, deux autres souches d'HTLV-3 furent identifiées de nouveau chez des individus camerounais, dont l'un était chasseur (Calattini et al., 2009; Zheng et al., 2010). Comme pour les PTLV-1, la proximité génomique des HTLV-3 et STLV-3 suggère une transmission du STLV-3 des singes aux hommes, plus particulièrement lors du dépeçage d'animaux infectés car les personnes contaminées par HTLV-3 déclarent ne pas avoir été mordues.

Aucune pathologie n'a encore été associée aux PTLV-3, bien que ces virus expriment une protéine Tax3, fonctionnellement très proche de la protéine Tax1 du HTLV-1. En effet, Tax3 a été décrite comme pouvant activer des promoteurs cellulaires ainsi que la voie NF- κ B, ou encore comme étant capable d'inhiber le facteur p53 (Chevalier et al., 2012; Gessain et al., 2013). La dernière étude menée par l'équipe de Renaud Mahieux permet de mieux caractériser les protéines des PTLV-3, avec notamment l'identification de trois nouvelles protéines auxiliaires, ainsi que la mise en évidence du pouvoir transformant des protéines Tax3 et APH-3 (*Antisense Protein of HTLV-3*), suggérant une potentielle pathogénicité de ces virus (Turpin et al., 2015).

Enfin, le groupe des PTLV-4 fut identifié il y a quelques années, en même temps que les premiers virus HTLV-3 (**FIGURE 1**). Il n'est constitué à l'heure actuelle que d'une souche d'HTLV-4, découverte chez un chasseur camerounais (Wolfe et al., 2005). La séquence du HTLV-4 présente 62 à 71% d'homologies avec celles des HTLV-1, 2 ou 3 (Switzer et al., 2009). Par ailleurs, l'analyse phylogénétique détaillée de cette souche montre qu'elle est clairement à part des trois autres groupes de PTLV répertoriés, mais également plus ancienne. L'équivalent simien du HTLV-4 a été recherché chez de nombreux singes au Cameroun, mais n'a pour l'instant pas été détecté (Liégeois et al., 2008; Sintasath et al., 2009).



FIGURE 2 : Distribution géographique de l'infection par HTLV-1 dans le monde.

Cette carte représente le nombre de personnes infectées par le virus HTLV-1 dans le monde, estimé à partir de l'analyse de 1.5 millions de patients séropositifs, situés dans des zones endémiques pour HTLV-1, ainsi qu'à partir des données épidémiologiques fiables obtenues au cours d'études chez des femmes enceintes, des donneurs de sang ou des populations adultes spécifiques. Les foyers de prévalence sont symbolisés par les cercles violets et leur taille varie suivant leur importance. Seules certaines régions dans le monde sont concernées par ces foyers, qui sont très localisés, comme par exemple la région Mashad en Iran ou celle de Tumaco en Colombie. Le Japon et l'Afrique sont des régions endémiques majeures de l'infection par HTLV-1. D'après (Gessain and Cassar, 2012).

I.2. Epidémiologie du HTLV-1

I.2.1. *Epidémiologie descriptive*

Une étude menée en 1993 par Guy de Thé et Robert Bomford a estimé qu'il y avait entre 10 et 20 millions de personnes infectées par HTLV-1 dans le monde (de Thé and Bomford, 1993). Plus récemment, Antoine Gessain et Olivier Cassar ont réévalué ce nombre en analysant les données disponibles pour près de 1.5 millions de personnes HTLV-1 séropositives, situées dans des zones endémiques, ainsi qu'en se basant sur des données épidémiologiques fiables provenant d'études récentes réalisées parmi des femmes enceintes, des donneurs de sang ou encore différentes populations adultes (Gessain and Cassar, 2012). Ils ont ainsi conclu qu'entre 5 et 10 millions de personnes seraient actuellement porteuses du virus sur la planète. Toutefois, ne disposant pas de données pour des pays comme la Chine, l'Inde, le Maghreb ou l'Afrique de l'Est, qui sont des régions fortement peuplées, ils estiment que le nombre de personnes infectées par HTLV-1 est certainement beaucoup plus élevé.

Du point de vue épidémiologique, le virus T lymphotrope humain de type 1 se caractérise par sa distribution géographique. En effet, ce n'est pas un virus ubiquitaire puisqu'il existe des foyers de forte endémie, souvent localisés à proximité de zones où le virus n'est quasiment pas présent (**FIGURE 2**). Dans ces régions endémiques, la séoprévalence est de plus de 2% parmi la population adulte et peut atteindre 20 à 40% chez des personnes de plus de 50 ans, appartenant à certains groupes spécifiques (Gessain and Cassar, 2012).

Les principaux foyers de forte endémie HTLV-1 sont situés dans le Sud du Japon, dans la région Caraïbe et ses alentours, en Amérique centrale et du Sud, notamment en Colombie et en Guyane française, mais également en Afrique intertropicale, comme dans le Sud du Gabon, ainsi que dans certaines régions du Moyen-Orient, comme le Nord-Est de l'Iran (**FIGURE 2**). Par ailleurs, des foyers isolés d'infection se trouvent dans quelques régions d'Australo-Mélanésie, notamment parmi les Aborigènes, ainsi qu'en Amérique du Nord et en Europe, comme par exemple en France, où l'infection par HTLV-1 se limite à des personnes venant de foyers endémiques ou à des consommateurs de drogues injectables.

La Roumanie semble, à l'heure actuelle, être le seul foyer endémique en Europe (Paun et al., 1994; Veelken et al., 1996).

A l'inverse, le Japon, qui compte près d'un million de porteurs asymptomatiques (Yamaguchi, 1994) avec une séroprévalence pouvant atteindre 37% dans certaines populations du Sud-Ouest (Goncalves et al., 2010), est l'une des régions endémiques majeures du HTLV-1, avec l'Afrique et ses plusieurs millions de personnes infectées (Gessain and Cassar, 2012).

L'origine de cette répartition en foyers géographiques ou ethniques, qui forment de véritables puzzles atypiques et caractéristiques de l'infection par HTLV-1, est mal connue. L'hypothèse avancée est que cette organisation proviendrait d'événements fondateurs initiaux, qui auraient lieu au sein de populations particulières et qui seraient suivis de la persistance d'une forte transmission virale, liée à des conditions environnementales ou socioculturelles favorables, mais qui n'ont pas encore été clairement identifiées (Proietti et al., 2005; Rouet et al., 1999). En effet, les foyers de forte endémie HTLV-1 sont souvent constitués de groupes de populations ayant vécu de façon assez isolée durant de longues périodes, comme c'est le cas dans la population noir-marron du Surinam et de Guyane française (Plancoulaine et al., 1998).

L'infection par HTLV-1 se caractérise, en outre, par l'augmentation progressive de la séroprévalence avec l'âge, plus chez les femmes que chez les hommes, et ce quel que soit leur environnement socio-économique ou culturel (Gessain and Cassar, 2012; Goncalves et al., 2010). Toutefois, ces observations sont à relativiser car cette augmentation peut-être due à un effet cohorte, comme cela a été montré au Japon, ou à une accumulation de contacts sexuels avec l'âge, qui pourrait favoriser l'infection (Chavance et al., 1989; Murphy et al., 1991; Ueda et al., 1989).

1.2.2. Epidémiologie moléculaire

Dès les premiers travaux d'épidémiologie moléculaire sur le HTLV-1, il est apparu que son génome était très peu variable, contrairement aux autres virus à génome ARN connus. Cette stabilité génomique s'explique par le mode de réplication du HTLV-1, qui utilise peu sa transcriptase inverse virale (RT, *Reverse Transcriptase*) pour dupliquer son génome, mais plutôt l'expansion clonale des cellules infectées. Ce mécanisme correspond à l'amplification, lors de la mitose cellulaire, du provirus intégré dans l'ADN des cellules, via l'ADN polymérase, beaucoup plus fidèle que la RT virale (Wattel et al., 1995). Cette grande stabilité génomique a également été observée pour les virus HTLV-2 (Vandamme et al., 2000).

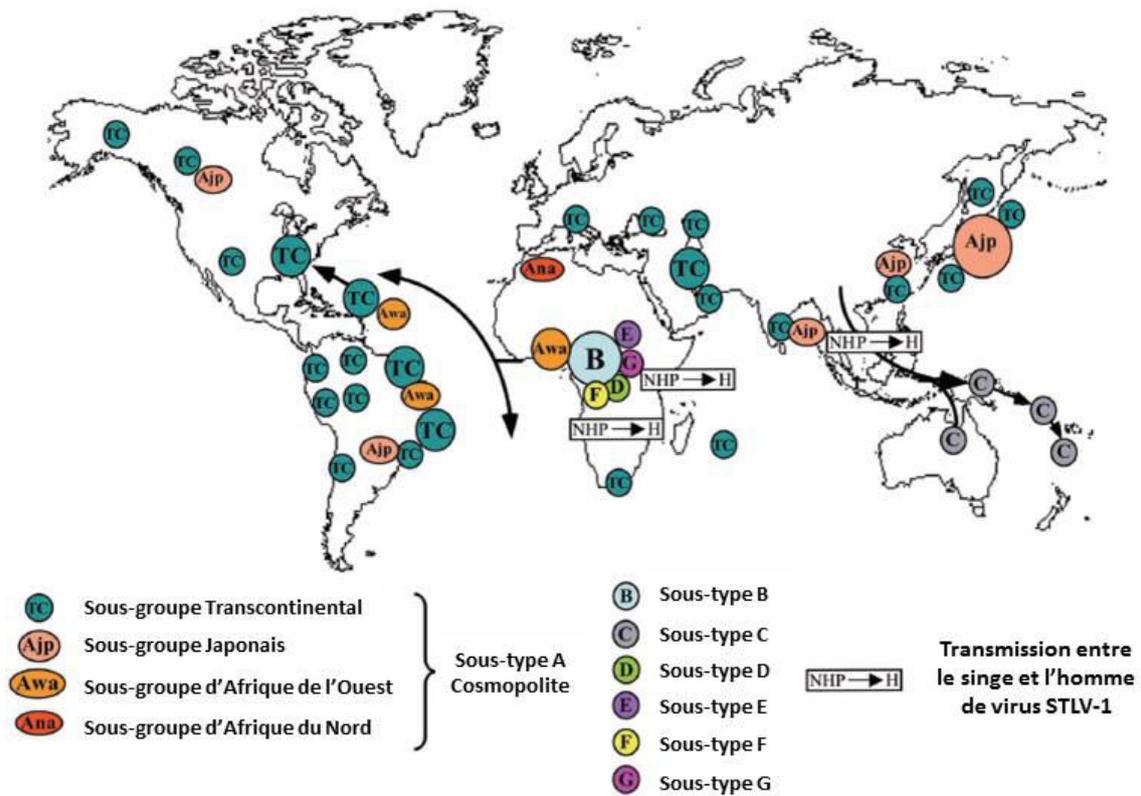


FIGURE 3 : Répartition géographique et dissémination des différents sous-types moléculaires d'HTLV-1.

Les sept sous-types d'HTLV-1 et leurs distributions dans le monde sont représentés sur cette carte : le sous-type A (ou Cosmopolite) avec ses différents sous-groupes moléculaires (Transcontinental (TC), le plus fréquent et le plus largement distribué ; Japonais (Ajp) ; Afrique de l'Ouest (Awa) ; Afrique du Nord (Ana)), le sous-type B localisé en Afrique centrale et le plus fréquent dans cette région fortement endémique, le sous-type C situé en Australie et en Mélanésie, le sous-type D présent en Afrique centrale, particulièrement dans certains groupes de Pygmées et enfin, les sous-types E, F et G dont très peu de souches ont été décrites et qui sont toutes localisées en Afrique centrale. Les flèches et les encadrés indiquent les très probables transmissions inter-espèces avec passages de STLV-1 de singes (NHP, *Non-Human Primates*) à l'homme (H), responsables des sous-types actuels d'HTLV-1 et de leurs répartitions. D'après (Gessain and Cassar, 2012).

La faible variation des séquences des HTLV-1 et 2 permet de suivre les migrations présentes et passées des populations humaines infectées, participant ainsi à une meilleure compréhension de l'origine, de l'évolution et des modes de dissémination de ces rétrovirus au cours du temps (Gessain et al., 1992; Yanagihara, 1994).

Malgré cette stabilité génomique, des variants moléculaires, également appelés génotypes, ont été découverts au sein des différents groupes d'HTLV, en lien avec l'origine géographique de ces virus (Slattery et al., 1999). En effet, parmi les virus HTLV-1, sept sous-types moléculaires, divergeant depuis près de 20 000 ans et associés chacun à une région géographique donnée, ont été identifiés (Van Dooren et al., 2001) (**FIGURE 3**).

Les quatre principaux sous-types décrits sont les sous-types A, B, C et D (Gessain and Cassar, 2012).

Le sous-type A, ou sous-type Cosmopolite, fut le premier à avoir été identifié et est également le plus répandu dans le monde. D'après la **FIGURE 3**, ce génotype est effectivement présent dans de nombreuses régions, notamment au sein des foyers endémiques du Japon, d'Afrique du Nord et de l'Ouest ou encore, d'Amérique centrale et du Sud. C'est par ailleurs le seul sous-type présent en Europe.

Bien que sa distribution géographique soit importante, la variabilité de séquence entre les souches du génotype A est faible, reflétant certainement son apparition plus récente dans les populations humaines (datant de quelques centaines, voire quelques milliers d'années tout au plus).

Grâce à l'analyse des LTR viraux, il est cependant possible de définir quatre sous-groupes moléculaires au sein du sous-type A : le sous-groupe d'Afrique du Nord dit « Ana » (Gasmi et al., 1994), le sous-groupe japonais dit « Ajp », le sous-groupe transcontinental dit « TC » (Miura et al., 1994), et enfin, le sous-groupe d'Afrique de l'Ouest dit « Awa » (Mahieux et al., 1997). Chacun de ces sous-groupes a une localisation géographique spécifique (**FIGURE 3**), qui s'explique par d'anciennes et massives migrations de populations (Gessain et al., 1992; Miura et al., 1994; Saksena et al., 1992).

Le sous-type B, ou sous-type d'Afrique centrale, a été découvert en 1985 chez un patient congolais atteint d'ATLL. Par la suite, une grande diversité de souches à l'intérieur de ce génotype fut mise en évidence, chacune semblant spécifique d'une localisation géographique particulière au niveau de l'Afrique centrale (Mahieux et al., 1997) (**FIGURE 3**).

Le sous-type C, ou sous-type Australo-Mélanésien, fut initialement décrit chez des Mélanésiens vivant en Papouasie Nouvelle-Guinée et dans les îles Salomon (**FIGURE 3**).

Récemment, il a été identifié chez des Aborigènes d'Australie ainsi que chez les habitants de l'archipel du Vanuatu (Cassar et al., 2007). Les souches de ce génotype C ont des séquences très divergentes des autres sous-types HTLV-1, reflet de longues périodes d'évolution de ces virus au sein de populations isolées, habitant sur différentes îles du Pacifique (Gessain and Cassar, 2012).

Le dernier sous-type important du HTLV-1, le sous-type D, a été décrit en 1997 chez trois habitants de la partie Ouest de l'Afrique centrale (Mahieux et al., 1997) (**FIGURE 3**). Il semble représenter une faible part des souches virales HTLV-1 présentes dans ces régions, contrairement au génotype B qui est plus fréquent.

En dehors des quatre sous-types majoritaires d'HTLV-1, trois autres génotypes, plus rares, appelés sous-types E, F ou G, ont été caractérisés chez des habitants d'Afrique centrale (Salemi et al., 1998; Wolfe et al., 2005) (**FIGURE 3**). La fréquence et la distribution géographique de ces génotypes restent encore mal connues.

L'existence de différents variants moléculaires parmi les virus HTLV-1 renforce l'hypothèse d'une origine simienne de ces virus, issus de transmissions inter-espèces de STLV-1 de singes aux hommes (Meertens et al., 2001; Salemi et al., 1998; Vandamme et al., 1998; Wolfe et al., 2005) (**FIGURE 3**). Par ailleurs, il semble que ces transmissions, à l'origine de l'émergence des HTLV-1 chez l'homme, aient principalement lieu en Afrique et en Asie, qui sont également les régions supposées de l'apparition de l'ancêtre commun des PTLV-1 (Asie) (Slattery et al., 1999), et plus globalement de l'ensemble des PTLV (Afrique) (Vandamme et al., 1998).

La question de l'association spécifique de ces génotypes à une pathologie comme l'ATLL ou la TSP/HAM, liées à l'infection par HTLV-1, n'a pas été mise en évidence à l'heure actuelle et semble peu probable. En effet, des études portant sur le séquençage de multiples isolats d'HTLV-1, provenant de patients présentant des ATLL ou des TSP/HAM, ainsi que de sujets HTLV-1 séropositifs sains, n'ont montré aucune association entre une séquence virale et une pathologie donnée (Komurian et al., 1991; Mahieux et al., 1997).

I.3. La transmission des virus HTLV

Le virus HTLV-1, et l'ensemble des virus HTLV, se transmettent assez difficilement dans les populations humaines et nécessitent, avant tout, des contacts répétés (Gessain, 2011). Trois principaux modes de transmission ont été répertoriés pour ces rétrovirus (**FIGURE 4**).

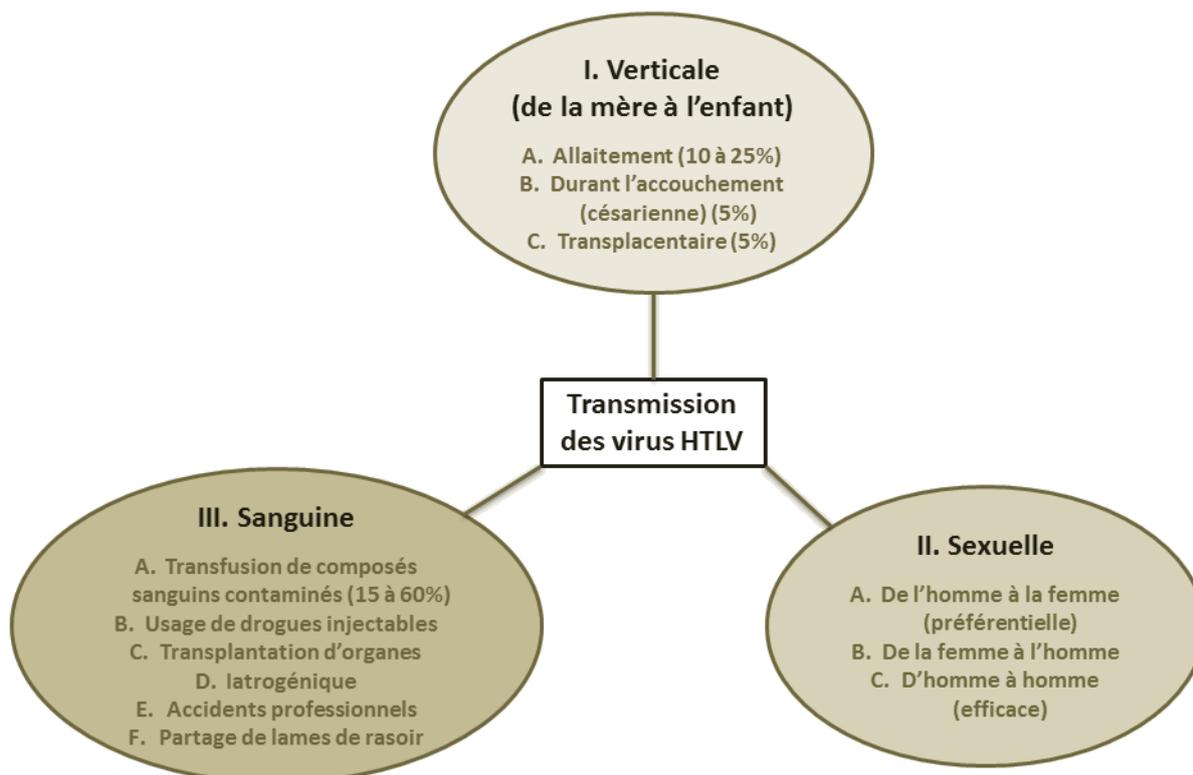


FIGURE 4 : Les principaux modes de transmission des virus HTLV.

Ce schéma a été élaboré d'après les données issues de (Paiva and Casseb, 2014) et de (Gessain and Cassar, 2012).

Le premier est une transmission de la mère à l'enfant, qui a été mise en évidence au Japon dans les années 1980 (Hino, 2011) (**FIGURE 4**). Le passage du virus se fait principalement par un allaitement prolongé de plus de six mois, avec cependant un taux de transmission assez faible, de l'ordre de 10 à 25% (Wiktor et al., 1997). Outre un allaitement prolongé, d'autres facteurs de risque favorisent la transmission verticale du virus, notamment un titre d'anticorps anti-HTLV élevé chez la mère, ainsi qu'une charge provirale importante dans le sang et le lait maternel (Li et al., 2004; Ureta-Vidal et al., 1999). La correspondance entre les antigènes HLA de type I (*Human Leukocyte Antigen*) de la mère et de l'enfant a également été décrite comme favorisant le transfert du HTLV lors de l'allaitement (Biggar et al., 2006).

D'autre part, la transmission verticale peut avoir lieu avant la naissance, de façon transplacentaire ou au cours d'un accouchement par césarienne, même si ces modes d'infection des virus HTLV restent assez rares, contrairement aux HIV (Carneiro-Proietti et al., 2014).

Les virus HTLV sont, en outre, présents dans les sécrétions génitales, ce qui leur permet d'être transmis lors de contacts sexuels (**FIGURE 4**). Ce mode de transmission constitue d'ailleurs la deuxième principale voie d'infection par HTLV (Paiva and Casseb, 2014). Des études ont montré que le virus est transmis de façon plus efficace, mais non exclusive, dans le sens homme-femme plutôt que dans le sens inverse, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la séroprévalence observée plus particulièrement chez les femmes avec l'âge (Kajiyama et al., 1986; Roucoux et al., 2005).

Par ailleurs, des infections préexistantes par d'autres pathogènes sexuellement transmissibles (syphilis, HSV-2,...) peuvent augmenter le risque de transmission horizontale du HTLV, en provoquant des ulcères et des inflammations au niveau des muqueuses génitales et anales. D'autre part, la présence d'anticorps anti-Tax ainsi qu'une charge provirale importante dans les lymphocytes circulants et au niveau des sécrétions génitales, sont autant de facteurs favorisant la transmission du virus (Paiva and Casseb, 2014).

Enfin, les rétrovirus HTLV peuvent être transmis par voie sanguine, lors de transfusion de composés sanguins contenant des lymphocytes T infectés (**FIGURE 4**). Le taux de transmission par transfusion de produits sanguins contaminés est en effet élevé chez le receveur, de l'ordre de 15 à 60%. A l'inverse, la transfusion de plasma ne permet pas de transmettre le virus, celui-ci étant très peu présent sous forme libre circulante dans l'organisme, mais avant tout dans les lymphocytes T (Gessain and Cassar, 2012; Sullivan et al., 1991).

Les virus HTLV peuvent aussi se transmettre chez les toxicomanes utilisant des drogues par voie intraveineuse, toujours par passage de cellules lymphoïdes infectées, lors de partage de seringues notamment (Feigal et al., 1991). Parmi ces consommateurs de drogues injectables, le virus HTLV-2 est fortement prévalent par rapport au HTLV-1 (Roucoux and Murphy, 2004).

La voie sanguine semble donc être la plus efficace pour la transmission des HTLV car elle permet l'échange direct de cellules infectées, que ce soit dans le cas de personnes recevant des composés sanguins contaminés ou dans celui d'usagers de drogues injectables.

Récemment, d'autres types de transmission impliquant des contacts sanguins ont été recensés, notamment des cas de transmission du HTLV-1 suite à des transplantations d'organes provenant de porteurs asymptomatiques en Europe (Toro et al., 2005), ou encore des cas de transmission iatrogénique dus à l'injection intramusculaire d'antiparasitaires contre la maladie du sommeil en Afrique équatoriale (Pépin et al., 2010).

La mise en place de moyens de détection et de prévention ciblant ces différents modes de transmission des HTLV est donc essentielle pour limiter leurs propagations à travers le monde et tenter d'endiguer l'infection.

I.4. Détection et prévention de l'infection par HTLV

I.4.1. Moyens diagnostiques

Le diagnostic de l'infection par HTLV repose soit sur la détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines virales (réalisable en routine), soit sur la mise en évidence directe du virus ou de ses composants (effectuée plus particulièrement dans des laboratoires spécialisés) (Gessain, 2011).

En ce qui concerne le diagnostic sérologique, il est constitué de deux étapes complémentaires : une étape de dépistage des anticorps d'une part et une étape de confirmation des résultats d'autre part. Ce diagnostic est également complété par la différenciation sérologique des anticorps dirigés contre les virus HTLV-1 ou HTLV-2.

Concernant le dépistage, la technique immunoenzymatique ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est la plus employée, en raison de sa sensibilité et de sa spécificité. Une étude a toutefois montré qu'il était préférable d'effectuer des analyses avec deux types de kits ELISA différents, afin de s'assurer de la validité du diagnostic (Verdonck et al., 2009).

Les kits ELISA commerciaux, actuellement disponibles, permettent de détecter de façon efficace à la fois les virus HTLV-1 et HTLV-2 (Thorstensson et al., 2002). Cependant, certains sera ou plasmas analysés par ELISA peuvent présenter des résultats douteux ou constituer des faux-positifs. Des tests de confirmation sont alors pratiqués sur ces échantillons, pour garantir la fiabilité du diagnostic établi.

Ces tests correspondent essentiellement à des immunoblots (WB, *Western Blot*) ainsi qu'à des tests immunoenzymatiques sur bandelette appelés INNO-LIA (*Innogenetics Line Immunoassay*), qui s'avèrent être une technique de confirmation plus fiable, plus spécifique et donnant moins de sérologies indéterminées que les immunoblots (Filippone et al., 2012; Thorstensson et al., 2002).

La détection directe du virus nécessite des techniques plus sensibles que les tests sérologiques, puisque le nombre de cellules infectées, en particulier chez les porteurs asymptomatiques, est assez faible, de l'ordre de 0.02 à 2% des lymphocytes T du sang circulant pour l'infection par HTLV-1 (Gessain, 2011). Deux techniques permettent de détecter directement les virus HTLV : l'amplification génique ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et la culture virale.

La PCR, qui est employée majoritairement, peut être réalisée à partir d'ADN extrait de lymphocytes, de concentrés leucocytaires du sang périphérique ou de biopsies ganglionnaires ou cutanées. Le séquençage des produits de PCR permet de diagnostiquer efficacement l'infection par HTLV, mais également de différencier les virus HTLV-1 et 2 (Vandamme et al., 1997; Vet et al., 1999). Cette technique PCR constitue, en outre, la base des études d'épidémiologie moléculaire et de phylogénie.

Par la suite, des méthodes de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR, *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) ont été développées, afin de confirmer les diagnostics établis par PCR et, dans le même temps, de quantifier la charge provirale, correspondant à l'ADN proviral, dans les lymphocytes T du sang périphérique (Casoli et al., 2014; Moens et al., 2009). Dans le cas de pathologies liées à l'infection par HTLV-1, une charge provirale élevée chez les patients est souvent prédictive d'une évolution clinique de mauvais pronostic (Iwanaga et al., 2010; Olindo et al., 2005).

La culture virale est la technique de référence pour la détection des HTLV et s'effectue à partir de lymphocytes, provenant de personnes dont l'infection est suspectée, voire de cellules ganglionnaires, pour les patients atteints d'ATLL.

Ces cellules sont alors cultivées seules ou, le plus souvent, en présence de cellules lymphoïdes immatures, comme les lymphocytes de sang de cordon, qui sont des cellules plus réceptives à l'infection. La mise en évidence des virus et de leur réplication se fait par immunocapture des antigènes viraux, dans les surnageants des cultures, et par immunofluorescence (IF) directe sur les cellules, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (Gessain et al., 1990). La microscopie électronique peut également être employée pour visualiser les particules virales dans les cultures, bien que leur production soit faible. Toutefois, cette technique de détection des HTLV par culture virale reste longue et coûteuse par rapport à l'identification par PCR.

En routine, le diagnostic d'une infection par HTLV repose au final sur le dépistage des anticorps par ELISA, suivi d'une confirmation par immunoblot. Dans le cas où l'immunoblot donne un résultat indéterminé, ou si le type de virus n'a pu être identifié, une analyse PCR est alors effectuée.

1.4.2. Prévention de l'infection

La prévention de l'infection par HTLV, en particulier par HTLV-1 responsable de pathologies graves, est absolument fondamentale, tout spécialement au niveau des régions endémiques. L'identification des principales voies de transmission des HTLV a permis de mettre en place différentes méthodes de prévention efficaces.

L'arrêt ou la diminution de la durée d'allaitement des enfants nés de mères diagnostiquées HTLV séropositives est l'une des mesures phares dans la prévention de la transmission verticale du virus. Elle est appliquée dans plusieurs zones endémiques, comme le Japon, ainsi que dans certains pays des Caraïbes et d'Amérique du Sud. Cette mesure s'avère être très efficace pour prévenir le développement d'ATLL à long terme. En effet, le gouvernement japonais, qui a lancé en 1987 le premier programme de prévention de l'ATLL, nommé ATL Prevention Program (APP), basé sur le dépistage des femmes enceintes et sur des recommandations faites aux femmes séropositives pour qu'elles évitent d'allaiter leurs enfants, a permis de diminuer le taux de transmission verticale du virus de 20 à 2.5% au Japon (Hino, 2011). Toutefois, cette mesure de prévention reste difficile à appliquer dans les pays en développement, et notamment dans certaines régions de forte endémie comme l'Afrique, où l'importante malnutrition des enfants est un véritable problème, ne laissant pas le choix de l'allaitement aux femmes africaines.

Par ailleurs, à l'heure actuelle il n'existe aucun moyen pour prévenir la transmission transplacentaire du virus ou celle qui peut survenir durant l'accouchement.

La prévention de la transmission des HTLV par contacts sexuels passe avant tout par l'utilisation de préservatifs, comme pour toute autre maladie sexuellement transmissible. Un service d'aide et de conseils à l'attention des couples sérodiscordants a également été mis en place au Japon, participant à la réduction de la prévalence HTLV (Paiva and Casseb, 2014).

Le risque de contamination par voie sanguine, notamment lors de transfusions, a été fortement diminué grâce à l'instauration du dépistage systématique des donneurs de sang (Laperche et al., 2015). Cette mesure est réalisée dans de nombreux pays, dont la France qui l'a instituée en 1989 dans les départements français d'Outre-Mer, pour lesquels la séroprévalence HTLV-1 était de l'ordre de 0.5 à 1.5% chez les donneurs de sang contre 0.001 à 0.003% en métropole, où cette mesure fut mise en pratique deux ans plus tard (Couroucé et al., 1998). Le dépistage des infections par HTLV-1 et 2 a également été rendu obligatoire dans les lactariums et lors des dons d'organes en France. Parallèlement au dépistage, l'emploi de sang déleucocyté a été mis en place dans différents pays européens, afin de réduire au maximum le risque de transmission du virus par transfusion (Laperche et al., 2009). Cependant, comme dans le cas de la prévention de la transmission des HTLV par allaitement, le dépistage systématique des dons de sang est difficile à réaliser dans les pays en développement, ce qui participe à l'expansion de l'infection. Dernièrement, des pays comme la Chine commencent tout de même à s'intéresser à cette question (Xie et al., 2015).

Concernant la transmission par voie intraveineuse chez les toxicomanes, l'information des usagers et la mise à leur disposition de seringues à usage unique sont pour l'instant les seuls moyens de prévention efficaces existants.

Du fait de l'absence de vaccin contre les virus HTLV, les méthodes de prévention constituent actuellement les meilleures solutions pour lutter contre ces infections. La faible variabilité génomique du virus ainsi que l'existence de modèles animaux, en particulier simiens ou bovins, sont des atouts pour l'élaboration d'une stratégie vaccinale. Le développement d'un vaccin atténué efficace contre le virus BLV, très proche du HTLV, est d'ailleurs une piste d'étude intéressante (Gutiérrez et al., 2014). Cependant, peu d'essais de vaccination contre les HTLV ont été réalisés jusqu'à présent, certainement freinés par l'efficacité des mesures préventives mais aussi par des aspects socio-économiques défavorables.

II. LES MÉCANISMES INFECTIEUX DU HTLV-1 : DES STRATÉGIES REDOUTABLES POUR PERSISTER ET ÉCHAPPER AU SYSTÈME IMMUNITAIRE

La morphologie et la structure des particules virales HTLV-1, tout comme les mécanismes impliqués dans sa réplication et notamment dans l'assemblage et la libération des virions, sont assez mal connus (Fogarty et al., 2011a). Des comparaisons avec d'autres rétrovirus, dont le HIV, ont permis de déterminer les caractéristiques morphologiques et génomiques du HTLV-1, qui s'avèrent être assez classiques des *Retroviridae*.

L'une des particularités des virus HTLV est la présence d'une région pX située en 3' de leur génome et codant, entre autre, pour deux protéines régulatrices Tax et Rex, essentielles à la multiplication virale (Yasunaga and Matsuoka, 2011).

La protéine Tax joue, en outre, un rôle central dans le pouvoir oncogène du virus HTLV-1, entraînant principalement une lymphoprolifération maligne de cellules T appelée ATLL (*Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*) (Matsuoka and Jeang, 2007).

L'infection par HTLV-1 peut également provoquer d'autres pathologies, comme la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM, *Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy*), qui est une neuromyélopathie chronique invalidante. De façon surprenante, seules 2 à 10 % des personnes infectées par HTLV-1 développent une des maladies associées au virus au cours de leur vie (Mahieux, 2011).

L'apparition de ces pathologies s'explique en partie par la persistance du virus dans l'organisme, qui met en place pour cela toute une stratégie d'échappement au système immunitaire, notamment à travers des modes de transmission de cellule à cellule spécifiques (Pique and Jones, 2012).

La compréhension des mécanismes moléculaires de l'infection et du processus oncogène est donc essentielle pour concevoir de nouvelles stratégies prophylactiques, ainsi que des thérapies moléculaires ciblées contre le virus HTLV-1, afin de limiter l'apparition des pathologies mortelles ou invalidantes liées à l'infection.

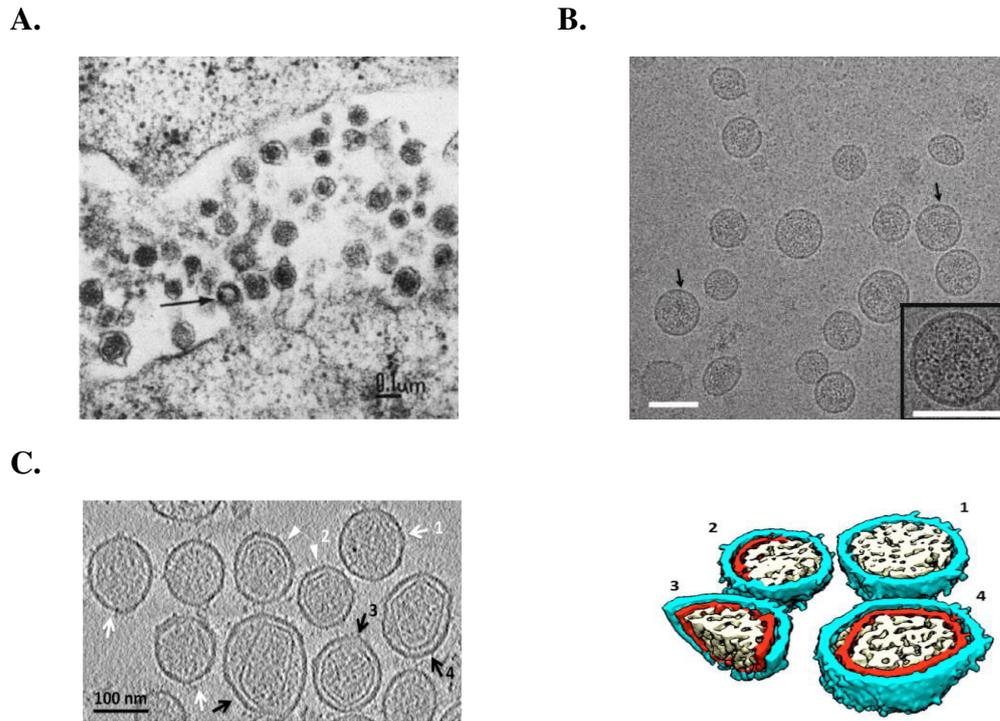


FIGURE 5 : Evolution de l'analyse morphologique des virions HTLV-1 par microscopie.

- A. Première caractérisation des particules virales HTLV-1 produites par la lignée cellulaire MT-2 en microscopie électronique. D'après (Miyoshi et al., 1981).
- B. Analyse morphologique de VLP (*Virus-Like Particles*) HTLV-1 produites à partir de cellules HEK 293T et observées en microscopie cryo-électronique (cryo-ET). D'après (Grigsby et al., 2010).
- C. Analyse morphologique de particules HTLV-1 produites et purifiées à partir de la lignée cellulaire MT-2 en microscopie cryo-ET. (**Panneau de gauche**) Les flèches noires indiquent les virions matures. (**Panneau de droite**) Les quatre particules numérotées ont été modélisées par tomographie avec en bleu l'enveloppe, en rouge la capsid et en beige le reste du « noyau » viral, comprenant le génome ainsi que les différentes protéines associées. D'après (Cao et al., 2015).

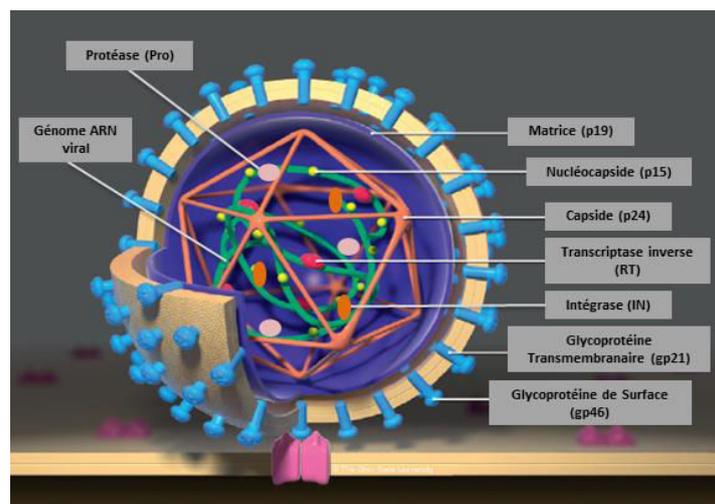


FIGURE 6 : Structure de la particule virale HTLV-1.

Représentation schématique du virion HTLV-1 et de ses principaux composants, d'après (Lairmore et al., 2012).

II.1. La particule virale HTLV-1

II.1.1. Morphologie du virion

L'équipe d'Isao Miyoshi fut la première à publier des images de microscopie électronique du virion HTLV-1, en même temps qu'ils identifiaient ce virus comme agent étiologique de l'ATLL (Miyoshi et al., 1981) (**FIGURE 5A**). La morphologie générale de la particule virale a donc été rapidement caractérisée, permettant d'identifier le HTLV-1 comme un rétrovirus de type C c'est-à-dire une particule de forme quasiment sphérique, contenant « un noyau » central avec une densité variable, entouré par une enveloppe.

Grâce aux observations des virions en microscopie électronique, le diamètre des particules HTLV-1 a pu être estimé à environ 95nm en moyenne, avec d'importantes variations suivant les virions (Doutree et al., 1992). L'apparition de nouvelles techniques, comme la microscopie cryo-électronique (cryo-ET, *cryo-Electron Tomography*), a permis de revoir la taille de ces particules, qui serait plutôt de l'ordre de 73nm de diamètre, avec toutefois des variations entre 30 et 237nm (Grigsby et al., 2010) (**FIGURE 5B**). Ces techniques ont également permis de détailler la structure moléculaire des virions HTLV-1 et de visualiser leurs différences par rapport aux particules du virus de l'Immunodéficience humaine (HIV), qui étaient jusqu'alors considérées comme similaires. En effet, au niveau de la capsid, les virions HTLV-1 matures présentent une architecture polyédrique tandis que les particules HIV ont une capsid conique (Briggs et al., 2003). Récemment, une étude réalisée en microscopie cryo-ET précise la structure capsidique des virions HTLV-1 et indique, de façon intéressante, que la plupart des particules observées ne possèdent pas de capsides définies ou entières, ce qui impacte probablement sur leur infectiosité (Cao et al., 2015) (**FIGURE 5C**).

L'ensemble des études menées ont ainsi permis de définir la composition générale des particules HTLV-1 (**FIGURE 6**).

D'après ces analyses, le virion possède une enveloppe correspondant à une bicouche lipidique d'origine cellulaire, dans laquelle sont incluses des glycoprotéines virales composées d'une sous-unité de surface, appelée gp46 ou SU (*Surface Unit*), et d'une sous-unité transmembranaire, appelée gp21 ou TM (*Transmembrane unit*) (Verdonck et al., 2007). Cette enveloppe est associée à une couche de protéines de matrice (p19 ou MA), qui ont été décrites comme étant capables de s'homodimériser et de s'organiser en hexamères, afin d'ancrer les glycoprotéines TM de l'enveloppe virale au centre de ces structures (Rayne et al., 2004).

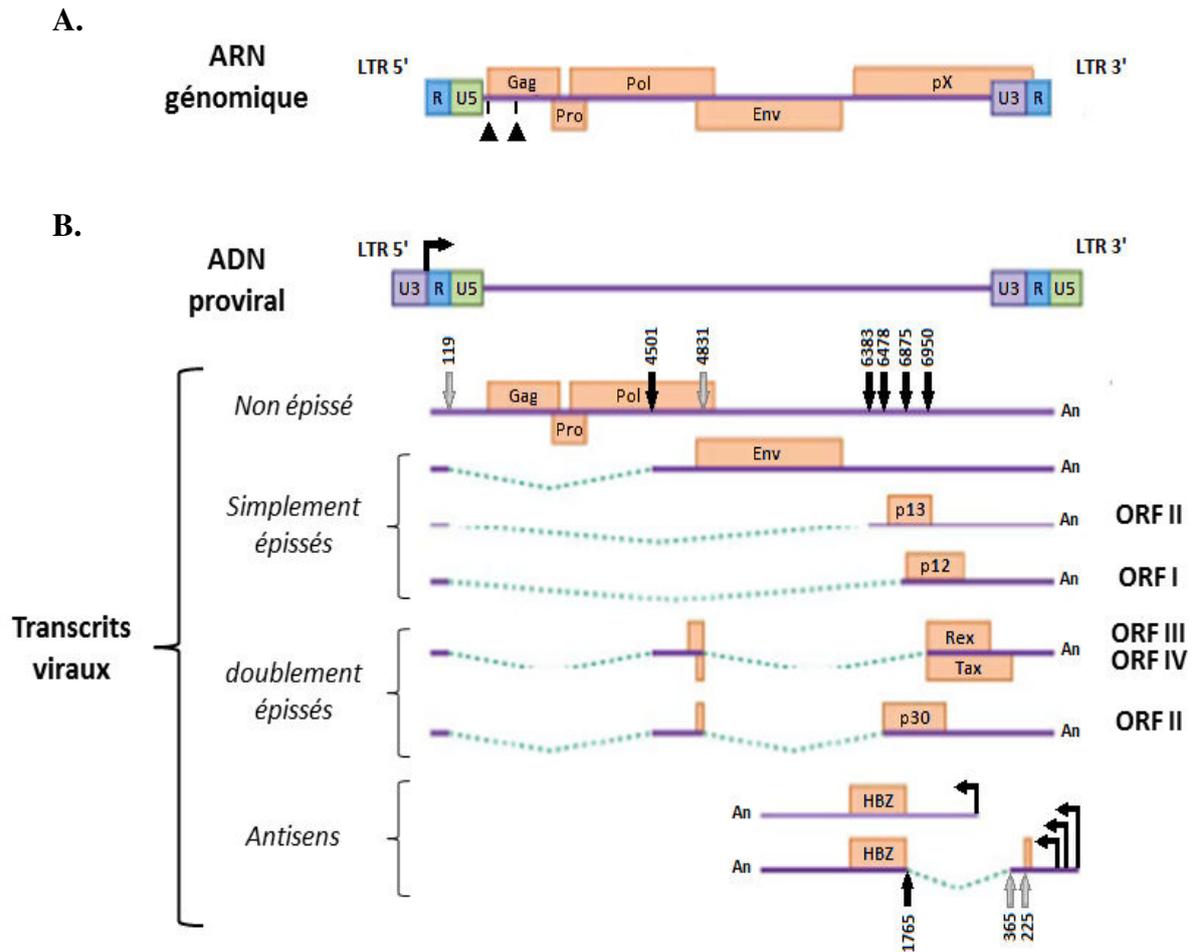


FIGURE 7 : Organisation génomique du virus HTLV-1.

- A.** Représentation schématique du génome ARN simple brin du HTLV-1. Les LTR sont présents à chacune des extrémités, composés de séquences répétées R et de séquences uniques U5 en 5' et U3 en 3'. Les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*, classiques des rétrovirus, sont indiqués ainsi que la région pX, spécifique des *Deltaretrovirus*. Les deux séquences correspondant à de probables signaux d'encapsidation de l'ARN génomique, identifiées dans le génome du virus BLV, sont symbolisées par des triangles noirs. D'après (Kannian and Green, 2010).
- B.** Représentations schématiques du génome proviral d'HTLV-1 et de ses transcrits viraux. Les séquences LTR identiques (U3/R/U5) qui encadrent l'ADN sont illustrées, tout comme les différents cadres ouverts de lecture (ORF) codant pour les protéines de structure (Gag et Env) et les enzymes virales (Pro et Pol). Les quatre ORF codant pour les protéines régulatrices et auxiliaires de la région pX sont également spécifiés. Les ARNm produits à partir du LTR 5' (majoritaire) et du LTR 3' (minoritaire) sont indiqués, ainsi que leurs différents épissages. Les traits en pointillés illustrent les introns épissés tandis que les traits pleins représentent les exons. Les sites donneurs (flèches blanches) et accepteurs d'épissage (flèches noires) sont précisés, tout comme leurs positions dans l'ARN génomique. D'après (Kannian and Green, 2010).

Les protéines de matrice participent à l'assemblage des virions sous la membrane plasmique et établissent un véritable lien entre l'enveloppe et la capsidie dans les particules virales. Cette capsidie icosaédrique, constituée de protéines p24 ou CA, renferme le complexe ribonucléoprotéique composé de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive, associées aux protéines de la nucléocapsidie, appelées p15 ou NC, ainsi qu'aux enzymes virales correspondant à la transcriptase inverse (RT), à l'intégrase (IN) et à la protéase (Pro) (Verdonck et al., 2007) (**FIGURE 6**). Par ailleurs, un ARN de transfert (ARNt) d'origine cellulaire, spécifique de la proline, a également été mis en évidence à l'intérieur de ces virions (Ruggero et al., 2014).

L'étude de la morphologie et de l'assemblage de la particule virale permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infectivité, la transmission ou encore le pouvoir pathogène du HTLV-1.

II.1.2. Génome viral et synthèse des protéines d'HTLV-1

Dans les virions, le génome d'HTLV-1 est sous la forme de deux copies d'ARN simple brin de 8.5kb chacune, polyadénylées en 3' et coiffées en 5'. Ces molécules possèdent, en outre, à leurs extrémités de longues séquences terminales répétées non codantes dites LTR (*Long Terminal Repeat*), constituées des régions R et U5 en 5' et des régions U3 et R en 3' (**FIGURE 7A**).

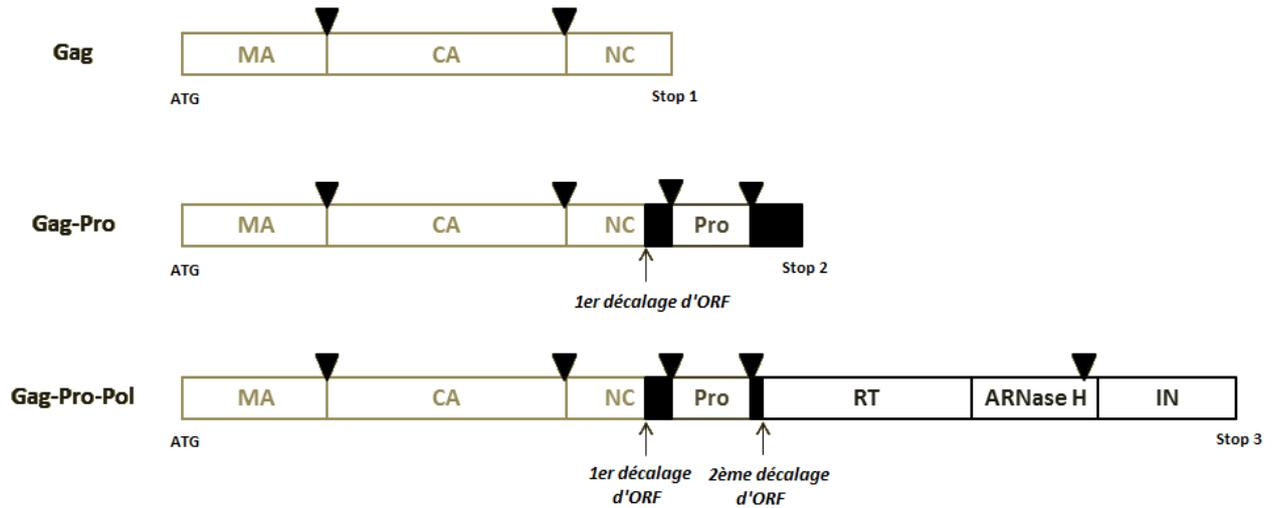
Au cours du cycle répliatif du virus, le génome ARN passe par une étape d'ADN double brin, grâce à sa transcriptase inverse, qui est ensuite importé et intégré dans la chromatine cellulaire, donnant alors naissance au provirus.

La séquence de l'ADN proviral du HTLV-1 a été, pour la première fois, entièrement décrite en 1983 et représente un peu plus de 9kb (Seiki et al., 1983).

Comme dans le génome ARN, l'ADN proviral est terminé par des séquences LTR, remaniées lors du processus de transcription inverse pour former des séquences identiques à chaque extrémité, constituées des régions U3, R et U5 (**FIGURE 7B**). Ces LTR possèdent des éléments de régulation (régions promotrices et signaux de polyadénylation), nécessaires à la transcription du génome proviral (Arpin-André et al., 2014).

Par ailleurs, la séquence du HTLV-1 contient des cadres ouverts de lecture (ORF, *Open Reading Frame*) codant pour les protéines de structure (Gag et Env) et pour les enzymes essentielles à la multiplication virale (Pro et Pol), classiquement retrouvés chez les rétrovirus.

A.



B.

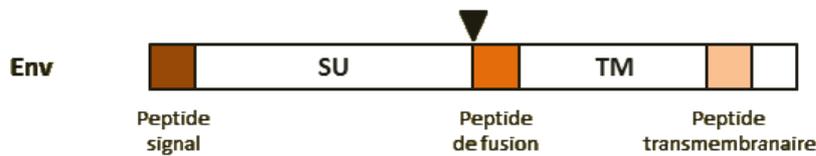


FIGURE 8 : Clivages des précurseurs polyprotéiques à l'origine des protéines de structure et des enzymes virales.

- A. Représentations schématiques des trois précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol synthétisés à partir de l'ARNm génomique viral non épissé, suite au décalage ou non du cadre ouvert de lecture (ORF). La localisation de ces différents décalages dans les précurseurs est indiquée (un seul changement d'ORF dans le cas de Gag-Pro et deux changements pour Gag-Pro-Pol). Les triangles noirs symbolisent les clivages protéolytiques réalisés par la protéase virale au sein de chaque précurseur, entraînant la libération des protéines de matrice (MA), de capsid (CA) et de la nucléocapsid (NC), ainsi que celle des enzymes virales transcriptase inverse (RT), à activité ARNase H, et intégrase (IN). D'après (Lairmore and Franchini, 2007).
- B. Représentation schématique du précurseur Env synthétisé à partir d'un ARNm génomique viral simplement épissé. Le triangle noir symbolise le clivage protéolytique réalisé par une protéase cellulaire au niveau de l'appareil de Golgi, entraînant la libération des sous-unités de surface (SU) et transmembranaires (TM). D'après (Lairmore and Franchini, 2007).

Le génome d'HTLV-1 se caractérise cependant par la présence d'une région supplémentaire, appelée pX, située entre le gène *env* et le LTR à l'extrémité 3', contenant quatre ORF codant pour plusieurs protéines régulatrices ou auxiliaires (Kannian and Green, 2010) (**FIGURES 7A** et **7B**).

Les protéines d'HTLV-1 sont donc synthétisées à partir de plusieurs types d'ARNm, épissés ou non, contenant parfois différents cadres ouverts de lecture. Ces mécanismes sont à l'origine de la diversité protéique du virus, observée malgré la taille limitée de son génome.

a) Synthèse des protéines de structure et des enzymes virales

Les protéines Gag, Pro et Pol sont produites à partir de l'ARNm génomique non épissé (**FIGURE 7B**). Des décalages successifs du cadre ouvert de lecture permettent la synthèse de trois précurseurs polyprotéiques, Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol, qui sont ensuite clivés par la protéase virale pour donner les différentes protéines de structure ainsi que les enzymes du HTLV-1 (Lairmore and Franchini, 2007) (**FIGURE 8A**).

Les précurseurs Gag/Gag-Pro/Gag-Pro-Pol, produits avec un ratio spécifique (9 Gag pour 1 Gag-Pro), sont myristylés à leur extrémité N-terminale, induisant leur fixation au niveau de la face interne de la membrane plasmique cellulaire. L'interaction entre deux molécules Gag-Pro-Pol génère par autoclivage la protéase virale, qui peut ensuite libérer les autres sous-unités. Ainsi, le clivage du précurseur Gag forme la protéine de matrice (MA ou p19), la protéine de capsid (CA ou p24) et la protéine de la nucléocapsid (NC ou p15) (Le Blanc et al., 2001).

Le clivage du précurseur Gag-Pro entraîne également la libération des protéines de structure p19, p24 et p15, ainsi que celle de la protéase virale (Pro).

Enfin, outre les protéines p19, p24, p15 et la protéase, le clivage du précurseur Gag-Pro-Pol aboutit à la libération de deux enzymes : la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN).

Dans le cadre du cycle viral, une partie des ARNm génomiques produits n'est pas utilisée pour la synthèse protéique mais est encapsidée dans les virions en cours de formation, pour servir de génome viral. Deux séquences situées au niveau du gène *gag* dans l'ARN génomique du virus BLV ont ainsi été identifiées comme des signaux d'encapsidation. Des séquences similaires ont également été retrouvées dans le génome d'HTLV-1 (Mansky and Gajary, 2002) (**FIGURE 7A**).

Les protéines Env sont, quant à elles, produites à partir d'un ARNm génomique simplement épissé, qui est ensuite traduit sous la forme d'un précurseur polyprotéique (**FIGURES 7B** et **8B**).

Ce précurseur est alors transloqué dans le réticulum endoplasmique (RE), puis clivé par une protéase cellulaire au niveau de l'appareil de Golgi, libérant finalement les sous-unités de surface (SU ou gp46) et transmembranaires (TM ou gp21) qui composent les glycoprotéines ancrées dans l'enveloppe virale (Lairmore and Franchini, 2007) (**FIGURE 8B**).

b) Synthèse des protéines régulatrices et auxiliaires

L'ensemble des protéines régulatrices et auxiliaires de la région pX sont codées par seulement quatre ORF différents (ORF I, II, III et IV), grâce au mécanisme d'épissage alternatif des ARN messagers ainsi qu'à la présence de différents codons internes d'initiation de la traduction (Berneman et al., 1992; Ciminale et al., 1992) (**FIGURE 7B**).

L'ORF I, produit à partir d'un ARNm simplement épissé, code pour la protéine auxiliaire p12 qui peut, par la suite, être clivée dans sa partie N-terminale pour générer une nouvelle protéine appelée p8 (**FIGURE 7B**).

Les protéines auxiliaires p13 et p30 sont codées par l'ORF II à partir de deux ARNm aux épissages alternatifs différents : l'ARNm simplement épissé produit p13 alors que la forme doublement épissée donne p30 (**FIGURE 7B**).

Ces protéines p12, p8, p13 et p30 ont d'abord été décrites comme non essentielles à la réplication virale *in vitro*, soulevant des interrogations quant à leurs fonctions dans l'infection (Derse et al., 1997). Des études ont ensuite montré qu'elles étaient nécessaires pour l'infectivité et la persistance du HTLV-1 *in vivo*, en protégeant notamment les lymphocytes T infectés de l'apoptose tout en favorisant leur prolifération ou encore, en participant à l'établissement de la latence virale (Edwards et al., 2011; Fukumoto, 2013).

Les ORF III et IV, produits à partir d'un ARNm doublement épissé, codent respectivement pour les protéines régulatrices Rex et Tax (**FIGURE 7B**). Ces protéines sont indispensables pour la réplication du virus *in vitro* et *in vivo*.

En effet, comme cela sera décrit plus en détail par la suite (partie III.1.), Tax transactive l'expression des gènes viraux ainsi que celle de certains gènes cellulaires impliqués, entre autre, dans la prolifération, l'apoptose ou le contrôle du cycle cellulaire, mais également dans les mécanismes de réparation des dommages dans l'ADN, ce qui favorisent l'immortalisation et la transformation des cellules infectées (Chlichlia and Khazaie, 2010).

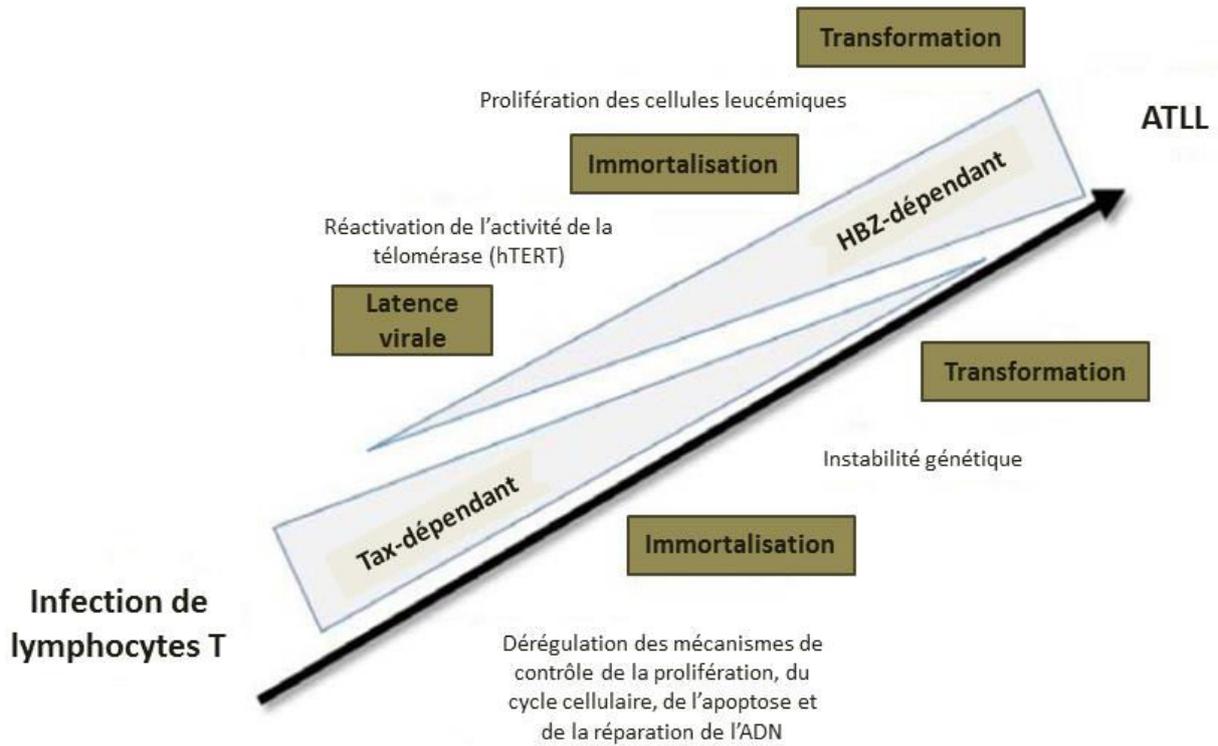


FIGURE 9 : Rôles des protéines Tax et HBZ dans l’histoire naturelle de l’infection par HTLV-1 conduisant au développement de l’ATLL.

Lors de l’infection de lymphocytes T *in vivo*, la protéine transactivatrice Tax s’exprime fortement et de manière précoce, provoquant l’activation de différentes voies cellulaires (NF- κ B, CREB/ATF,...) et la dérégulation des mécanismes de contrôle de la prolifération, de la division, de l’apoptose et de la réparation de l’ADN cellulaire dans lesquels elles sont impliquées. L’expression de Tax décroît progressivement au cours de l’infection, tandis que la protéine HBZ est exprimée en permanence. L’expression d’HBZ contrebalance l’effet activateur de Tax grâce à son interaction avec différents facteurs cellulaires, cibles de Tax, favorisant ainsi la persistance des cellules infectées. Par ailleurs, la protéine HBZ induit la réactivation des fonctions de la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*), et permet ainsi aux cellules immortalisées de proliférer. D’après (Mahieux, 2011).

La protéine Rex, quant à elle, agit au niveau post-transcriptionnel, en induisant spécifiquement l'export nucléaire des ARNm viraux non épissés ou monoépissés, jouant donc un rôle central dans l'infectivité et la propagation virales (Younis and Green, 2005).

Une deuxième protéine, appelée p21Rex, correspondant à une forme tronquée de la protéine Rex, a également été identifiée comme étant codée par l'ORF III, à partir d'un ARNm simplement épissé. Sa fonction exacte dans le cadre de l'infection par HTLV-1 reste, à ce jour, peu claire (Younis and Green, 2005).

c) Synthèse de transcrits antisens

Dans le génome viral d'HTLV-1, tous les ARNm décrits précédemment sont transcrits à partir du LTR 5'. Toutefois, une activité de transcription antisens, c'est-à-dire à partir du LTR 3' au niveau du brin de polarité négative, a également été découverte dès 1989 (Larocca et al., 1989). Ce n'est qu'en 2002 que la protéine HBZ (*HTLV-1 Basic leucine Zipper factor* ou *HTLV-1 bZIP factor*), issue de cette transcription antisens, a été mise en évidence (Gaudray et al., 2002). Actuellement, deux ARNm antisens (l'un monoépissé majoritaire et l'autre non épissé minoritaire) ont été décrits comme étant à l'origine d'HBZ (**FIGURE 7B**).

Cette protéine antisens du HTLV-1 interagit avec de nombreux facteurs cellulaires, comme CREB (*cAMP Response Element Binding*) ou certaines protéines de la famille Jun (c-Jun, JunD, JunB) via son domaine bZIP, mais également avec CBP (*CREB Binding Protein*)/p300 ou encore les facteurs NF- κ B, modulant ainsi la transcription des gènes viraux et cellulaires. Ces mécanismes permettent notamment de contrer la transactivation excessive de ces gènes induite par Tax, afin de favoriser la latence virale ainsi que la prolifération des lymphocytes T infectés (Barbeau and Mesnard, 2015). Récemment, l'activation de certains miARN oncogènes cellulaires (miR17 et miR21) par HBZ a été démontrée comme participant à la prolifération des cellules et à leur instabilité génomique (Vernin et al., 2014). La protéine HBZ, comme la protéine Tax, serait donc impliquée dans le processus oncogène se déroulant lors des infections par HTLV-1, en promouvant la persistance des cellules infectées, ce qui permettrait de maintenir un état d'infection chronique chez les personnes contaminées, favorisant ainsi le développement de pathologies, comme l'ATLL. Ces données, appuyées par la détection constante d'HBZ dans les cellules infectées et leucémiques contrairement à l'expression de Tax qui elle est rare chez les patients ATLL (Takeda et al., 2004), ont permis de définir un modèle de l'histoire naturelle de l'infection conduisant à une lymphoprolifération maligne, dans lequel interviennent des phases plus ou moins dépendantes des protéines Tax ou HBZ (**FIGURE 9**).

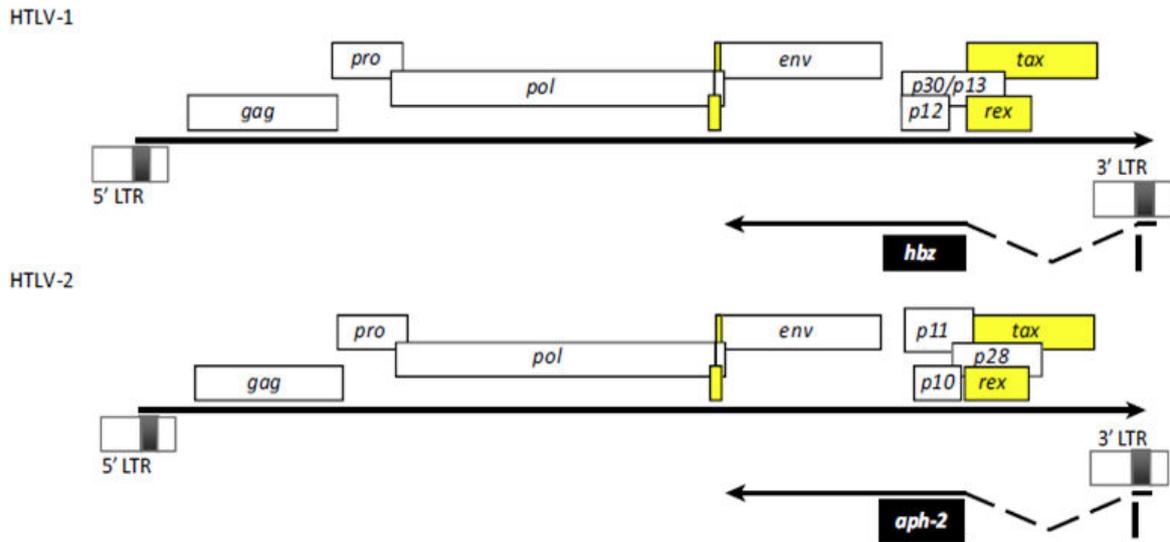


FIGURE 10 : Comparaison de l'organisation génomique des virus HTLV-1 et HTLV-2.

Les différents cadres ouverts de lecture codant pour les protéines sens du HTLV-1 et 2 sont représentés, ainsi que les transcrits antisens des deux virus (HBZ pour HTLV-1 et APH-2 pour HTLV-2). Les protéines de structure et les enzymes virales sont identiques pour les deux virus tandis que de nombreuses différences apparaissent au niveau de leurs protéines auxiliaires et régulatrices. Les exons correspondant aux différentes protéines régulatrices sont colorés en jaune. D'après (Barbeau and Mesnard, 2015).

Des protéines antisens ont, en outre, été identifiées dans les virus HTLV-2, 3 et 4 mais leurs rôles dans la modulation de certains composés cellulaires restent à ce jour assez flou. Une protéine antisens, appelée ASP, a également été mise en évidence dans le virus HIV-1 et serait plutôt impliquée dans la réplication et la production virales (Barbeau and Mesnard, 2015).

Le virus HTLV-1 synthétise donc un grand nombre de protéines différentes qui participent à l'infectivité, la multiplication ou encore la pathogénicité virale. En raison de la taille limitée de son génome, ce rétrovirus a développé un système unique de régulation de son expression, permettant cette diversité protéique. Ainsi, les stratégies d'épissage alternatif, associées notamment aux chevauchements des ORF ainsi qu'à l'utilisation des LTR 5' et 3' pour la transcription du génome viral, sont autant d'éléments participant à ce système de régulation (Journo et al., 2009a).

De façon intéressante, la comparaison des génomes d'HTLV-1 et 2 montre d'importantes similitudes au niveau de leurs organisations génomiques, particulièrement en ce qui concerne les protéines structurales et les enzymes virales, qui sont identiques (**FIGURE 10**). Toutefois, il existe des différences notables au niveau de leurs protéines auxiliaires, avec notamment l'existence d'un cinquième ORF dans la région pX d'HTLV-2, codant pour une protéine p11 dont la fonction exacte n'est pas connue, ainsi qu'au niveau de leurs protéines régulatrices (Anupam et al., 2013; Rende et al., 2012). En effet, à l'inverse de Tax1, Tax2 ne peut activer la voie NF- κ B dite non canonique ou induire de l'instabilité génomique, contribuant à la transformation des cellules infectées *in vivo* (Shirinian et al., 2013). Par ailleurs, il existe également des différences structurelles entre ces deux protéines régulatrices puisque, contrairement à Tax1, Tax2 ne possède pas de domaine de liaison au motif PDZ. Ces disparités concernant leurs protéines auxiliaires et régulatrices pourraient expliquer les différences de pathogénicité observées entre les deux virus.

II.2. Les étapes cellulaires clés de l'infection par HTLV-1

II.2.1. Cellules cibles du virus

Le tropisme cellulaire du virus HTLV-1 *in vitro* est assez vaste, alors qu'au contraire *in vivo* se sont préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ qui sont infectés. En effet, près de 90% de l'ADN proviral HTLV-1 détecté chez des patients atteints d'ATLL ou de TSP/HAM, se situe dans des cellules T CD4⁺ (Richardson et al., 1990).

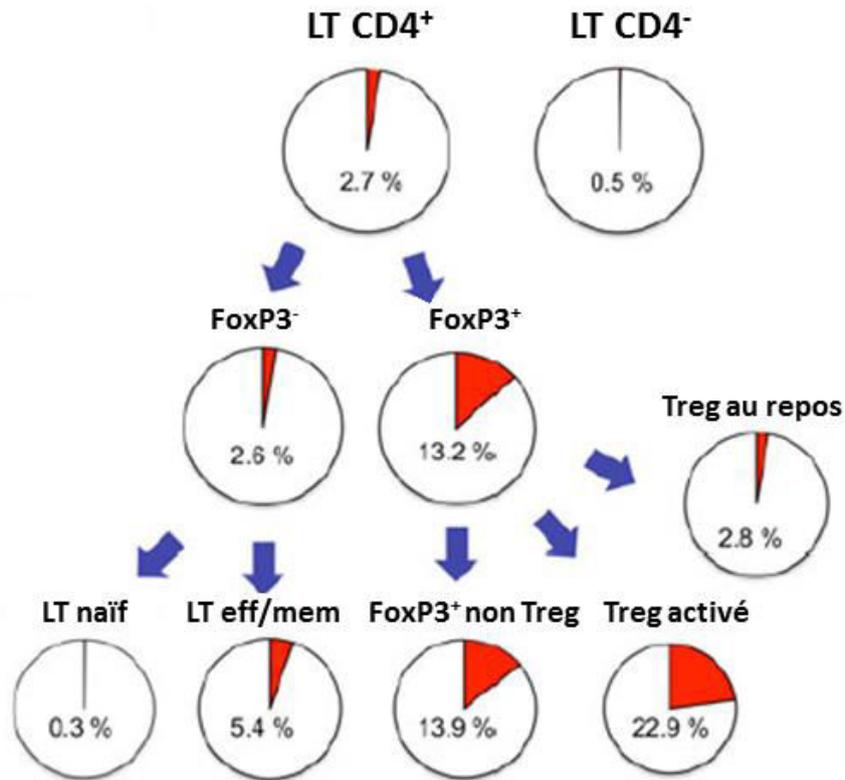


FIGURE 11 : Taux d'infection par HTLV-1 des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺.

Les sous-populations de lymphocytes T (LT) CD4⁺ sont représentées, ainsi que leurs pourcentages d'infection par HTLV-1. Les cellules possédant le marqueur FoxP3 (FoxP3⁺) sont des cibles préférentielles du virus, et plus particulièrement les lymphocytes T régulateurs (Treg) activés. Les lymphocytes T effecteurs et mémoires (LT eff/mem) ont également des taux d'infection importants par rapport aux cellules naïves (LT naïf). Ces pourcentages ont été calculés à partir de l'expression de la protéine virale Tax et correspondent à la moyenne des valeurs obtenues chez 23 patients asymptomatiques. D'après (Satou and Matsuoka, 2013).

Les lymphocytes T CD8⁺, plus particulièrement ceux qui sont spécifiques des antigènes d'HTLV-1, ont également été décrits comme étant infectés par le virus *in vivo*, constituant donc un réservoir viral supplémentaire (Hanon et al., 2000; Nagai et al., 2001).

De façon intéressante, le virus HTLV-2 infecte préférentiellement les lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*, par rapport aux CD4⁺ ou aux autres types de cellules immunitaires (Lal et al., 1995). Ces différences entre HTLV-1 et HTLV-2 se retrouvent également dans leur pouvoir transformant, puisqu'HTLV-1 transforme uniquement les CD4⁺ *in vitro* et *in vivo*, tandis qu'HTLV-2 transforme de préférence les CD8⁺ *in vitro* (Wang et al., 2000; Ye et al., 2003). Le déterminant génétique de ce tropisme spécifique au niveau de la transformation cellulaire a été identifié dans le gène viral Env (Xie and Green, 2005). Par ailleurs, ce tropisme a dernièrement été caractérisé comme un événement post-infection, dû à la prolifération sélective d'un type de lymphocytes suivant le virus, qui s'accroît au cours du temps (Kannian et al., 2012).

L'infection de ces cellules T conduit à de nombreux bouleversements, notamment au niveau transcriptomique, entraînant des modifications cellulaires qui contribuent à la persistance et à la transformation des cellules infectées, favorisant ainsi le développement de pathologies liées à HTLV-1, comme l'ATLL (Thénoz et al., 2014).

L'analyse précise des lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1 a permis de déterminer que le virus cible préférentiellement les CD4⁺ activés, aussi appelés effecteurs, exprimant entre autre le marqueur CD25, correspondant au récepteur de l'IL-2 (Yamano et al., 2004) (**FIGURE 11**). Il a également été prouvé que l'infection virale induit la diminution des lymphocytes T naïfs chez les patients ATLL (Yasunaga Ji et al., 2001).

D'autre part, le tropisme du virus HTLV-1 pour certaines sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ *in vivo* a pu être détaillé (**FIGURE 11**).

Les cellules T activées mémoires, caractérisées par le marqueur CD45 RO, ont ainsi été identifiées comme des cellules cibles d'HTLV-1 (Richardson et al., 1990). Leur multiplication anormale a, en outre, été démontrée chez des personnes infectées (Asquith et al., 2007).

Une autre population de lymphocytes T CD4⁺, correspondant aux cellules T régulatrices (T_{reg}), a également été décrite comme infectée par le virus (**FIGURE 11**). En effet, un taux d'infection élevé de ces T_{reg} a été mis en évidence chez des personnes contaminées par HTLV-1 (Satou et al., 2012), ainsi que l'expression du facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*), qui est le marqueur caractéristique des lymphocytes T_{reg}, dans des cellules de patients ATLL (Chen et al., 2006; Yano et al., 2007).

La fréquence élevée de T_{reg} infectés pourrait s'expliquer notamment par la présence, à leur surface, du marqueur CCR4 qui a pour ligand la chimiokine CCL22, dont la production est induite par Tax dans les lymphocytes T infectés (Hieshima et al., 2008; Toulza et al., 2010). Ainsi, la sécrétion de CCL22 par ces cellules T induirait le recrutement des T_{reg} qui pourraient alors à leur tour être infectés par HTLV-1 (Matsuoka and Jeang, 2011).

Une autre hypothèse est que la protéine virale HBZ, exprimée dans les lymphocytes T $CD4^+$ infectés, induit la différenciation des cellules en lymphocytes T régulateurs, via l'augmentation de l'expression du gène codant pour FoxP3 (Satou et al., 2011). Ce mécanisme fait intervenir l'activation de la voie TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) par HBZ, connue pour induire l'expression du facteur FoxP3 (Chen et al., 2003; Zhao et al., 2011).

En ciblant ces différentes sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$, le virus HTLV-1 perturbe des éléments clés dans la régulation de la réponse immune cellulaire et humorale, garantissant ainsi la survie et la prolifération des cellules infectées.

La présence du HTLV-1 a, en outre, été identifiée *in vitro* dans des thymocytes immatures, entraînant une altération de leur développement, avec un défaut de maturation de leurs pré-TCR (*T Cell Receptor*) (Wencker et al., 2007). Ce résultat suggère que l'infection des cellules hématopoïétiques immatures pourrait être à l'origine du développement de l'ATLL, de nombreuses années après l'infection (Banerjee et al., 2010).

D'autres types de cellules immunitaires ont été mis en évidence comme étant des réservoirs viraux *in vivo*. Ainsi, le virus HTLV-1 a été détecté dans des lymphocytes B, des monocytes ou encore, dans des lymphocytes T Natural Killer invariants (iNKT), qui exercent des fonctions immunorégulatrices (Azakami et al., 2009; Koyanagi et al., 1993).

Les cellules dendritiques, myéloïdes et plasmacytoïdes, sont également des cibles d'HTLV-1 (Jones et al., 2008; Macatonia et al., 1992). De par leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes (APC, *Antigen-Presenting Cell*), les cellules dendritiques infectées peuvent recruter et interagir avec des lymphocytes T $CD4^+$, favorisant alors leur infection.

Ces cellules dendritiques jouent donc un rôle central dans la transmission, la dissémination et la persistance virales *in vivo*.

Des cas d'infection par HTLV-1 de cellules non immunitaires ont enfin été recensés, notamment au niveau des cellules endothéliales *in vitro* (Hoxie et al., 1984).

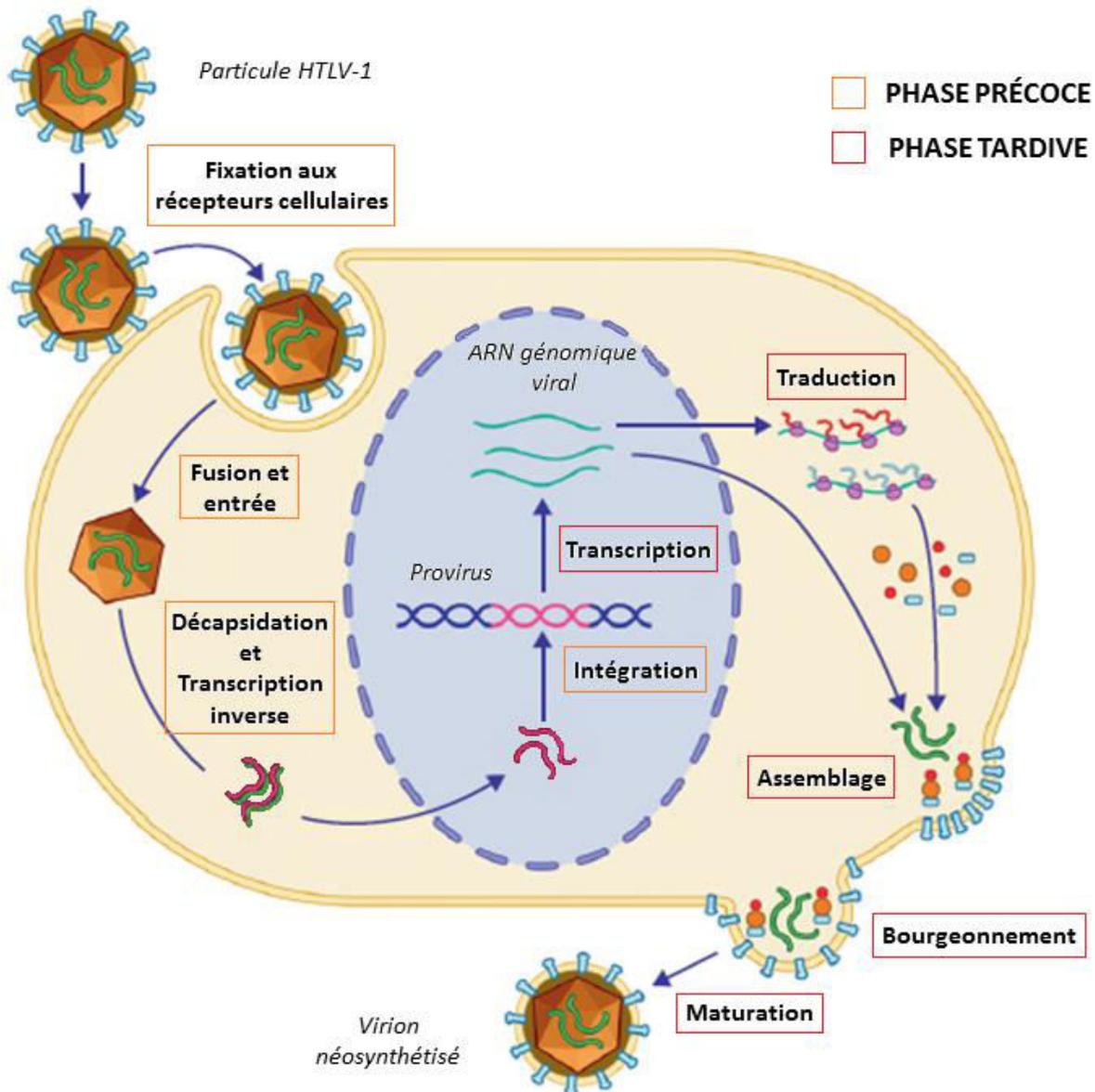


FIGURE 12 : Cycle de multiplication viral du HTLV-1, commun aux rétrovirus.

Représentation schématique simplifiée du cycle du virus HTLV-1, classique des rétrovirus, comprenant des étapes précoces et des étapes tardives. Les étapes précoces correspondent à l'entrée du HTLV-1 dans les cellules cibles, par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, suivie de la décapsidation du virus et de la transcription inverse de son ARN génomique en ADN double brin, capable de s'intégrer dans le génome cellulaire pour former un provirus. Les étapes tardives comprennent la transcription de l'ADN proviral, permettant la synthèse des composants viraux, qui sont ensuite assemblés sous la membrane plasmique pour former de nouvelles particules. Les virions néosynthétisés sortent alors des cellules par bourgeonnement puis ils subissent un processus de maturation pour donner naissance à de nouvelles particules infectieuses HTLV-1. D'après (Lairmore et al., 2012).

Une étude a d'ailleurs démontré l'infection productive des cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique. Une altération de l'expression des protéines constituant les jonctions serrées entre les cellules infectées a alors été constatée, entraînant une augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique, favorisant notamment le passage de lymphocytes. Le dysfonctionnement de cette barrière, essentielle pour la régulation de l'homéostasie du système nerveux central, est un des éléments pouvant expliquer le développement de la TSP/HAM chez les personnes contaminées par HTLV-1 (Afonso et al., 2008).

Les astrocytes de la barrière hématoencéphalique ont par ailleurs été identifiés comme étant infectés par HTLV-1 *in vitro*, ce qui contribuerait à la perturbation du système nerveux central (Szymocha et al., 2000a, 2000b). Cependant, l'infection non productive et latente dans ces cellules indique que le virus ne peut réaliser un cycle répliatif complet, suggérant donc que les astrocytes ne sont pas des cibles privilégiées d'HTLV-1.

II.2.2. Cycle de multiplication du HTLV-1

Le virus HTLV-1 possède un cycle de multiplication qui est globalement commun à l'ensemble des rétrovirus. Ce cycle peut être décomposé en deux phases principales : une phase dite précoce et une phase dite tardive (**FIGURE 12**).

a) La phase précoce du cycle viral

La phase précoce comprend les étapes du cycle allant de l'entrée du virus à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée, aboutissant à la formation du provirus (**FIGURE 12**).

La reconnaissance des cellules cibles et la fixation des particules virales à leur surface sont des événements cruciaux dans le cycle de multiplication conduisant à l'entrée du virus. Ces processus ont d'ailleurs fait l'objet de nombreuses recherches, au sein de notre laboratoire ainsi que dans d'autres équipes, aboutissant à l'identification des trois protéines cellulaires de surface impliquées dans l'entrée du HTLV-1 qui sont HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycans*), GLUT1 (*Glucose Transporter 1*) et NRP-1 (*Neuropilin-1*) (Ghez et al., 2006; Jones et al., 2005; Manel et al., 2003; Piñon et al., 2003). De façon intéressante, seules GLUT1 et NRP-1 ont été mises en évidence dans l'entrée du virus HTLV-2 (Ghez et al., 2006; Jones et al., 2006).

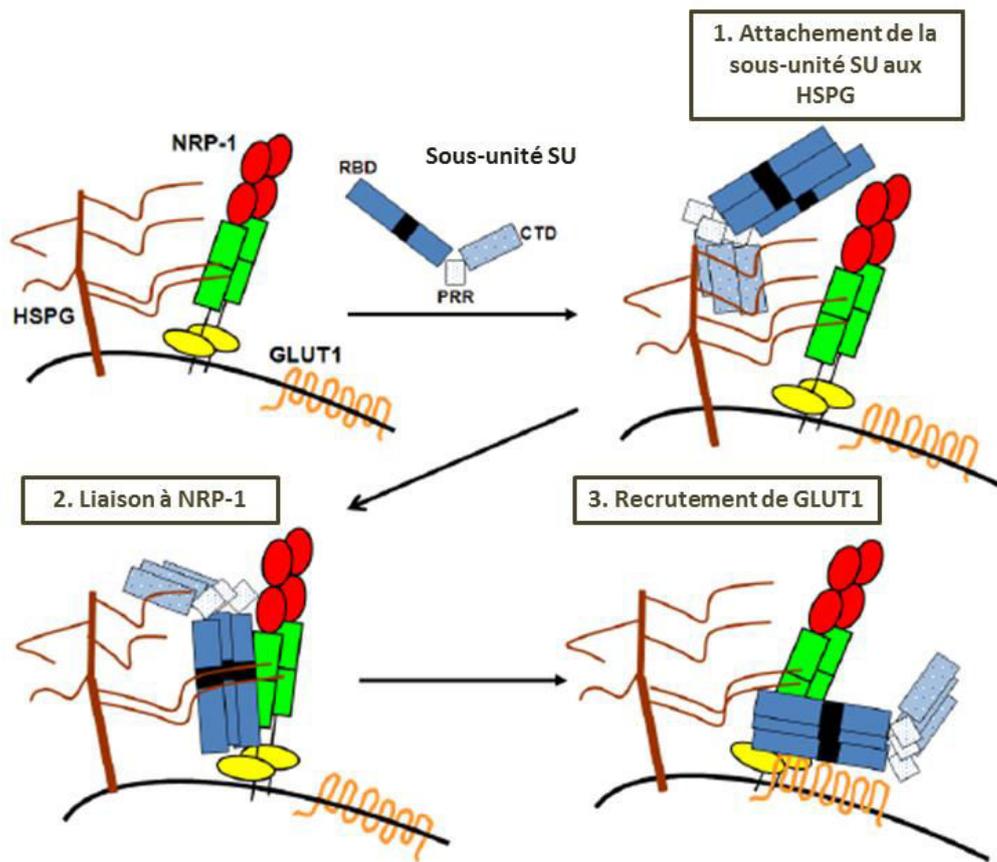


FIGURE 13 : La coopération entre HSPG, NRP-1 et GLUT1 induit l'entrée du virus HTLV-1 dans les cellules cibles, via leurs interactions avec la sous-unité SU virale.

Modèle représentant la liaison de la sous-unité SU des glycoprotéines de l'enveloppe virale d'HTLV-1 aux protéines cellulaires de surface HSPG, NRP-1 et GLUT1, conduisant à l'entrée du virus dans les cellules. La sous-unité SU est illustrée avec les trois domaines qui la composent : le domaine CTD interagissant avec HSPG, le domaine PRR (*Proline Rich Region*) permettant la flexibilité de la sous-unité et le domaine RBD (*Receptor Binding Domain*) dans lequel se situe le motif KKP_NR interagissant avec NRP-1, ainsi que les résidus D106 et Y114 nécessaires à sa liaison avec GLUT1 (ce motif et ces résidus sont symbolisés par le rectangle noir). La première étape correspond à l'interaction du domaine CTD de la sous-unité SU avec les chaînes d'héparane sulfate (HS) d'HSPG. Ces chaînes d'HS recrutent également NRP-1, favorisant ainsi la liaison entre NRP-1 et la sous-unité SU virale, via son motif KKP_NR. Suite au changement de conformation de la protéine SU, induit par la formation du complexe SU/HSPG/NRP-1, ses résidus D106 et Y114 sont exposés et peuvent interagir avec GLUT1. D'après (Jones et al., 2011).

Par ailleurs, il a été montré qu'il existe une coopération entre ces trois molécules pour fixer la sous-unité SU des glycoprotéines de l'enveloppe virale et permettre l'entrée du virus (Hoshino, 2012; Jones et al., 2011) (**FIGURE 13**).

En effet, grâce à son domaine CTD (*C-Terminal Domain*), la sous-unité SU interagit avec HSPG, induisant l'attachement et la concentration des particules HTLV-1 à la surface des cellules cibles. Les chaînes d'héparane sulfate étant capables d'interagir avec la neuropiline 1, la sous-unité SU peut alors se lier à la protéine NRP-1 recrutée par HSPG, grâce à son motif KKPNR, retrouvé dans le ligand naturel de NRP-1, VEGF-165 (Lambert et al., 2009). Cette étape permet la transition de la phase d'attachement à la phase de liaison du HTLV-1 aux cellules. La formation de ce complexe SU/HSPG/NRP-1 induit un probable changement de conformation de la sous-unité virale, favorisant l'exposition de ses résidus D106 et Y114, identifiés comme étant nécessaires pour la liaison de SU avec le transporteur GLUT1. Cette liaison entre SU et GLUT1 induit finalement la fusion des membranes, via l'insertion du peptide de fusion de la sous-unité TM des glycoprotéines d'enveloppe virales, dans la membrane plasmique cellulaire. Ce peptide, initialement masqué dans les glycoprotéines, est exposé suite aux changements de conformation induits par la formation du complexe SU/HSPG/NRP-1. Après cette fusion, la capsid virale peut alors entrer dans le cytoplasme cellulaire.

Une fois dans le cytoplasme, la capsid est désorganisée et le génome ARN simple brin du virus est rétrotranscrit en ADN double brin, grâce à un mécanisme classique chez les rétrovirus qui fait intervenir la transcriptase inverse virale (**FIGURE 14**). Cette ADN-polymérase ARN-dépendante, caractéristique des rétrovirus, initie la synthèse de l'ADN viral à partir d'un ARNt cellulaire spécifique de la proline, présent dans les particules virales et qui se lie spécifiquement à la séquence unique PBS (*Primer Binding Site*) dans l'ARN génomique (Seiki et al., 1982) (**FIGURE 14**). Récemment, des fragments correspondant à la partie 3' de ces ARNt ont été mis en évidence dans des virions HTLV-1 et ont été, en outre, décrits comme induisant l'initiation de la transcription inverse, suggérant ainsi une possible compétition entre ces fragments et les ARNt proline (Ruggero et al., 2014).

L'ADN obtenu est associé à des protéines cellulaires et virales, comme les protéines de la nucléocapsid, formant ainsi un complexe de pré-intégration appelé PIC (*Pre-Integration Complex*). Contrairement aux lentivirus comme le HIV-1, le complexe PIC du HTLV-1 ne peut franchir l'enveloppe nucléaire. Son intégration n'est donc possible que lorsque la cellule infectée entre en mitose, phase durant laquelle son enveloppe nucléaire est désorganisée.

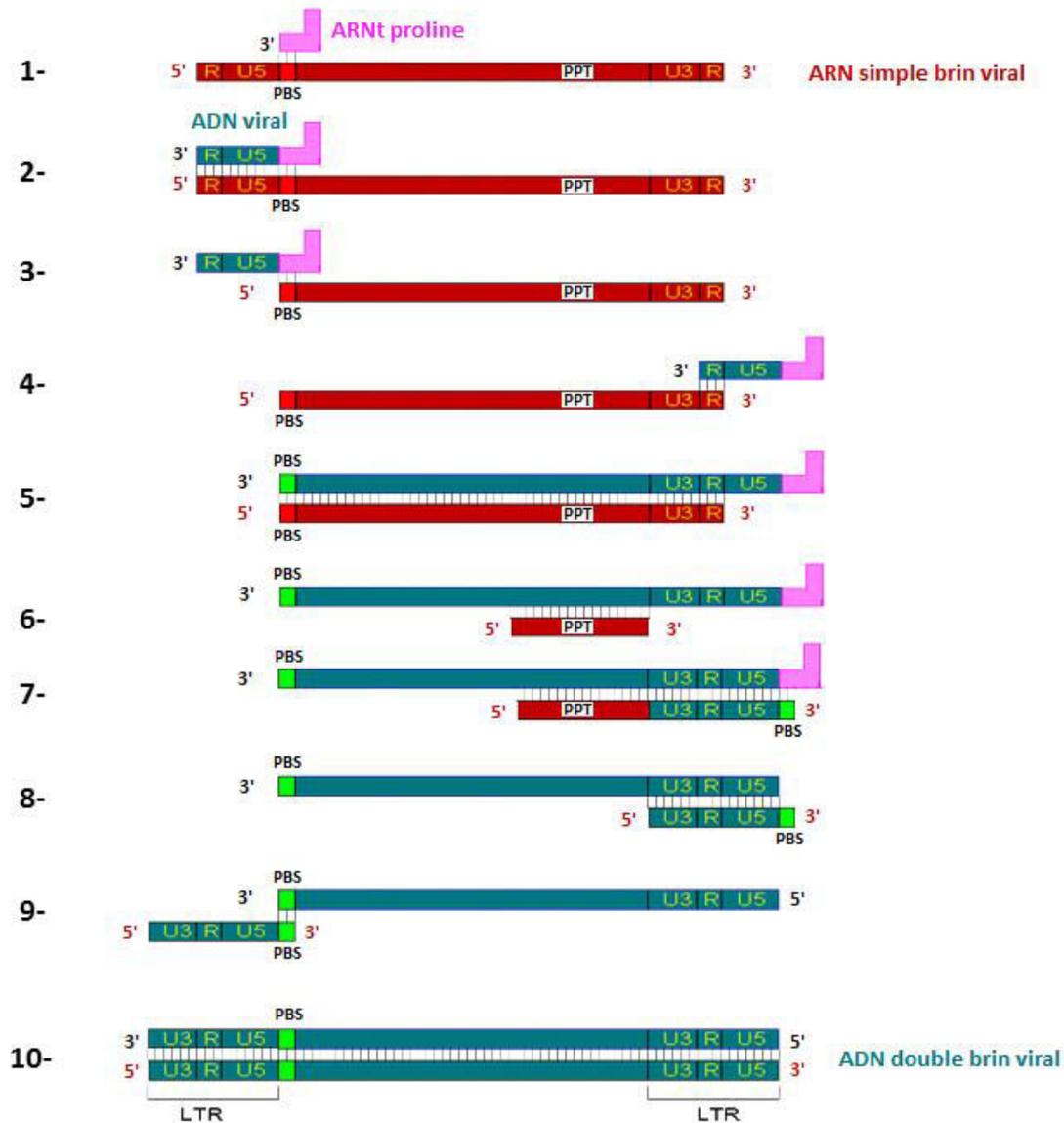


FIGURE 14 : Le mécanisme de la transcription inverse chez les rétrovirus.

Représentation schématique de la transcription inverse (ou rétrotranscription) permettant aux rétrovirus de convertir leur ARN génomique simple brin en ADN double brin. Ce mécanisme est catalysé par la transcriptase inverse (RT) du virus, qui possède à la fois une activité ADN polymérase et une activité ARNase H, lui permettant d'hydrolyser le brin d'ARN matrice. L'ARN viral est en rouge, l'ADN néosynthétisé en bleu et l'ARNt en rose. Les différentes étapes de la transcription inverse sont illustrées. (1) L'ARNt cellulaire, spécifique de la proline, se lie à la séquence PBS dans l'ARN génomique viral. (2) La RT synthétise un premier fragment d'ADN, correspondant aux régions R et U5, à partir de l'ARNt, utilisé comme amorce. (3) Les séquences R et U5 de l'ARN sont dégradées par l'activité ARNase H de la RT. (4) Premier transfert du brin d'ADN néosynthétisé au niveau de la région R, située à l'extrémité 3' de l'ARN. (5) Reprise de la synthèse du brin d'ADN par la RT. (6) Parallèlement à cette synthèse, la RT dégrade le brin d'ARN matrice, à l'exception de la séquence PPT qui est résistante à l'activité ARNase H de la RT. (7) Le second brin d'ADN est synthétisé à partir de la séquence PPT, qui sert d'amorce. (8) L'ARNt ainsi que les séquences d'ARN restantes sont dégradés par la RT. (9) Second transfert de brin d'ADN au niveau de la séquence PBS, située à l'extrémité 3' du premier brin synthétisé. L'hybridation des séquences PBS des deux brins d'ADN induit une circularisation partielle du génome, favorisant la fin de leur synthèse. (10) Obtention d'une double hélice d'ADN viral avec, à ses extrémités, des séquences LTR identiques et complètes, constituées des régions U3/R/U5.

L'étape d'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire, spécifique des rétrovirus, peut alors avoir lieu grâce à l'intégrase du virus.

Une étude récente a montré que les cellules infectées portent en majorité une seule copie provirale au sein de leur chromatine (Cook et al., 2012).

Par ailleurs, l'intégration du génome viral, qui était au départ considérée comme aléatoire (Seiki et al., 1984), a été décrite comme étant spécifique de certaines régions de la chromatine cellulaire. En effet, des données récentes prouvent que les provirus se situent principalement au niveau de l'euchromatine, correspondant à la partie transcriptionnellement active de la chromatine, et plus particulièrement au niveau de certaines régions de liaison de facteurs de transcription, notamment celles des facteurs p53 et STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) (Gillet et al., 2011; Melamed et al., 2013).

b) La phase tardive du cycle viral

Les étapes suivant l'intégration virale et la formation du provirus appartiennent à la phase tardive du cycle de multiplication (**FIGURE 12**).

Au cours de cette phase, le virus HTLV-1 détourne la machinerie cellulaire pour transcrire son génome proviral et produire l'ensemble des ARNm décrits précédemment, qui peuvent être soit traduits en protéines virales pour reformer les composants du virion, soit encapsidés dans les particules en cours de formation pour leur servir de génome.

Dès le début de l'infection, les protéines régulatrices Tax et Rex sont rapidement et fortement produites dans les cellules infectées. En effet, l'ARNm doublement épissé à partir duquel sont synthétisées ces protéines est vite pris en charge par la machinerie cellulaire d'export des ARNm.

Dans un deuxième temps, la protéine Rex induit l'export rapide des ARNm viraux non épissés ou simplement épissés dans le cytoplasme, évitant ainsi leur épissage complet. Ces molécules pourront alors être traduites dans le cytoplasme grâce à la machinerie cellulaire pour donner les protéines de structure et les enzymes virales, nécessaires à la constitution de nouveaux virions (Hidaka et al., 1988). Dernièrement, cette spécificité de Rex par rapport aux ARNm viraux a cependant été remise en cause, puisqu'il a été montré que cette protéine pouvait également favoriser l'export des ARNm doublement épissés viraux, alors que ce processus était considéré comme étant indépendant de Rex (Bai et al., 2012).

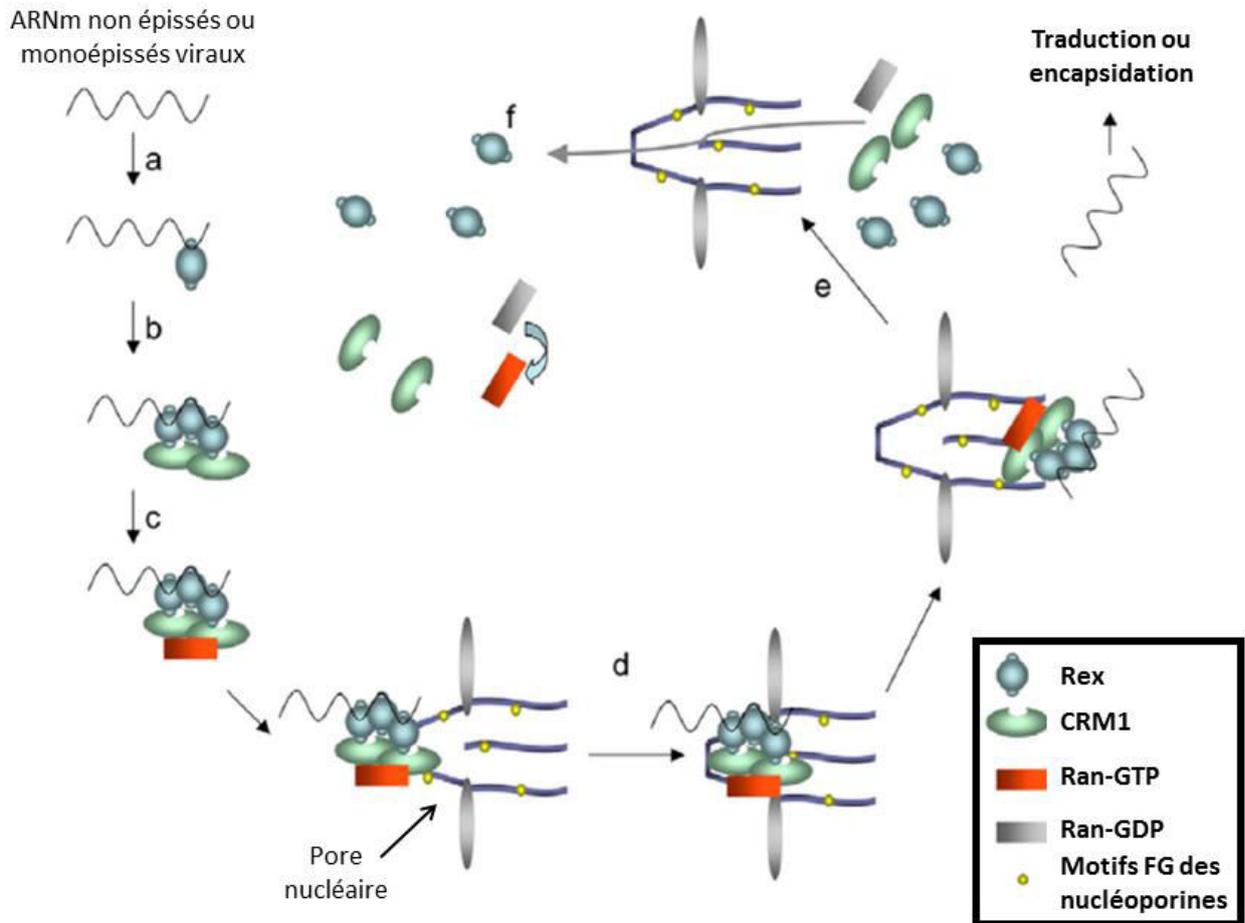


FIGURE 15 : Export des ARNm non épissés ou monoépissés viraux par la protéine Rex.

Représentation schématique du cycle effectué par la protéine Rex pour exporter les ARNm non épissés ou monoépissés viraux du noyau vers le cytoplasme. (a) Suite à leur transcription, les ARNm non épissés ou monoépissés se lient à Rex au niveau de leur séquence RxRE. (b) Rex s'oligomérisse et recrute l'exportine CRM1. (c) Le complexe ARNm/Rex/CRM1 est reconnu par la protéine Ran sous forme GTP (Ran-GTP) qui se lie à son tour à ces molécules. (d) Les interactions entre CRM1 et notamment les motifs répétés phénylalanine-glycine (motifs FG) contenus dans les nucléoporines permettent le passage du complexe ARNm/Rex/CRM1/Ran-GTP à travers les pores de la membrane nucléaire. (e) Une fois dans le cytoplasme, Ran-GTP est hydrolysé en Ran-GDP, induisant la dissociation du complexe et la libération de l'ARNm viral, qui est soit traduit en protéine soit utilisé en tant que génome dans les nouveaux virions formés. (f) Les autres composants du complexe, dont Rex, repartent dans le noyau grâce à leurs signaux d'import nucléaire (NLS). D'après (Younis and Green, 2005).

Le mécanisme d'export employé par Rex correspond à un véritable cycle, effectué entre le noyau et le cytoplasme cellulaire (**FIGURE 15**). Ainsi, avec son signal d'import nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*), la protéine Rex migre dans le noyau puis se lie aux éléments RxRE (*Rex Responsive Element*), localisés dans le LTR 3' des ARNm viraux, grâce à son domaine RBD (*RNA Binding Domains*) (Bogerd et al., 1991; Seiki et al., 1988). En se liant aux ARNm non épissés ou monoépissés, Rex empêche leur épissage et même leur dégradation, augmentant ainsi leur stabilité. Rex va alors s'oligomériser et recruter l'exportine 1, aussi appelée CRM1 (*Chromosome Region Maintenance interacting protein 1*), qui interagit avec son signal d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*) (Hakata et al., 1998) (**FIGURE 15**). La protéine Ran sous forme GTP reconnaît et s'associe à ces molécules, entraînant la formation d'un complexe oligomérique, capable de franchir la membrane du noyau, à travers les pores nucléaires. Après avoir libéré l'ARNm viral dans le cytoplasme, la protéine Rex pourra revenir dans le noyau, grâce à son signal d'import nucléaire, afin de prendre en charge l'export d'un nouvel ARNm (Younis and Green, 2005) (**FIGURE 15**).

Par ailleurs, une étude a démontré que Rex pouvait inhiber l'épissage des ARNm, favorisant ainsi l'export de l'ensemble des ARNm non épissés par la machinerie cellulaire et par conséquent, la production des protéines de structure virales, tandis que l'expression des protéines Tax et Rex était diminuée (Gröne et al., 1996).

Au cours de l'infection, il existe donc une véritable régulation de l'expression du génome viral, exercée d'une part au niveau post-transcriptionnel par Rex, et d'autre part au niveau transcriptionnel par Tax. En effet, la protéine Tax active fortement la transcription du génome proviral, grâce au détournement de différentes protéines cellulaires, dont les facteurs CREB/ATF (*cAMP Response Element Binding protein/Activating Transcription Factor*), au niveau des promoteurs viraux situés dans les LTR (Green and Chen, 1990). Ces mécanismes font partie de la stratégie mise en place par la protéine Tax pour favoriser la persistance de l'infection qui sera détaillée par la suite (partie III.1.).

Par ailleurs, la protéine auxiliaire p30, localisée au niveau du noyau et des nucléoles, est capable de se lier aux ARNm de Rex et de Tax et ainsi d'empêcher leur exportation dans le cytoplasme (Ghorbel et al., 2006; Nicot et al., 2004). Cette protéine pourrait donc participer à la régulation de l'expression génomique du virus HTLV-1, en inhibant sa réplication.

Suite à la synthèse des différents ARNm viraux, les précurseurs polyprotéiques correspondant aux composants de la particule virale peuvent donc être traduits.

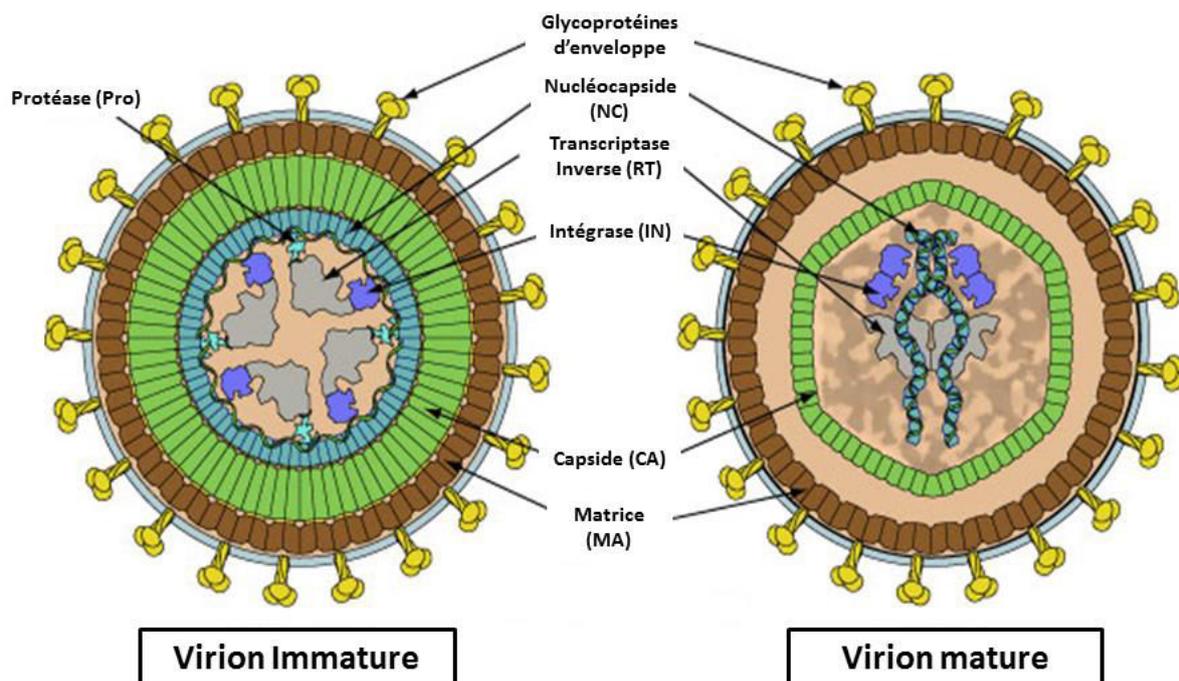


FIGURE 16 : Réorganisation structurale des particules HTLV-1 lors de leur maturation.

Représentation schématique de la particule virale HTLV-1 immature et mature, après clivage des précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol, induisant la libération des protéines de structure et des enzymes virales. Cette maturation entraîne une réorganisation structurale visible de la particule. D'après le site internet ViralZone (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/60.html).

Le précurseur Env des glycoprotéines de l'enveloppe virale est produit au niveau du réticulum endoplasmique (RE), grâce aux ribosomes cellulaires, où il subit ensuite différentes modifications, dont son oligomérisation en trimères (Rosenberg et al., 1999). Ce précurseur est ensuite transféré dans l'appareil de Golgi, où il est clivé par une protéase cellulaire, libérant ainsi les sous-unités SU et TM. Enfin, ces sous-unités, associées en trimère, rejoignent la membrane plasmique dans laquelle elles sont intégrées (Pique et al., 1992).

Les précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol sont traduits directement dans le cytoplasme. La myristoylation de l'extrémité N-terminale de ces précurseurs permet leur ancrage au niveau de la membrane plasmique, à proximité des glycoprotéines d'enveloppe virales, et marque le début de leur oligomérisation (Fogarty et al., 2011b). De façon intéressante, ces précurseurs s'intègrent dans la membrane plasmique au niveau de microdomaines riches en tétraspanines, notamment CD82, permettant ainsi de localiser les protéines virales et leur assemblage dans une région cellulaire précise (Mazurov et al., 2006).

Outre l'association des glycoprotéines d'enveloppe et des précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol sous la membrane plasmique, l'ARNm génomique viral, exporté dans le cytoplasme par Rex, est également recruté, grâce à son association avec les précurseurs Gag (Morcock et al., 2000). Pendant l'association de ces différents composants, les virions commencent à bourgeonner au niveau de la membrane plasmique. Le motif PPPY, situé dans le domaine MA du précurseur Gag et qui est retrouvé chez d'autres rétrovirus, permet ensuite la libération des virions HTLV-1 formés, dans le milieu extracellulaire (Le Blanc et al., 2002). Un autre motif, PTAP, localisé dans ce même domaine MA, semble également impliqué dans le processus de libération, même si son rôle reste encore sujet à controverse (Heidecker et al., 2004; Wang et al., 2004).

Après leur libération, les virions HTLV-1 subissent une étape finale de maturation, au cours de laquelle les précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol sont clivés par la protéase virale, entraînant l'apparition de l'ensemble des protéines structurales et des enzymes virales (MA, CA, NC, RT, IN et Pro). Cette étape se caractérise par une réorganisation structurale des particules, parfaitement identifiable en microscopie électronique (**FIGURE 16**).

La maturation achève la formation des virions, qui sont alors libres d'infecter de nouvelles cellules. Toutefois, contrairement à d'autres rétrovirus, les particules HTLV-1 produites lors du cycle de multiplication sont peu infectieuses, ce qui entraîne une transmission particulière du virus, participant à sa stratégie d'échappement au système immunitaire.

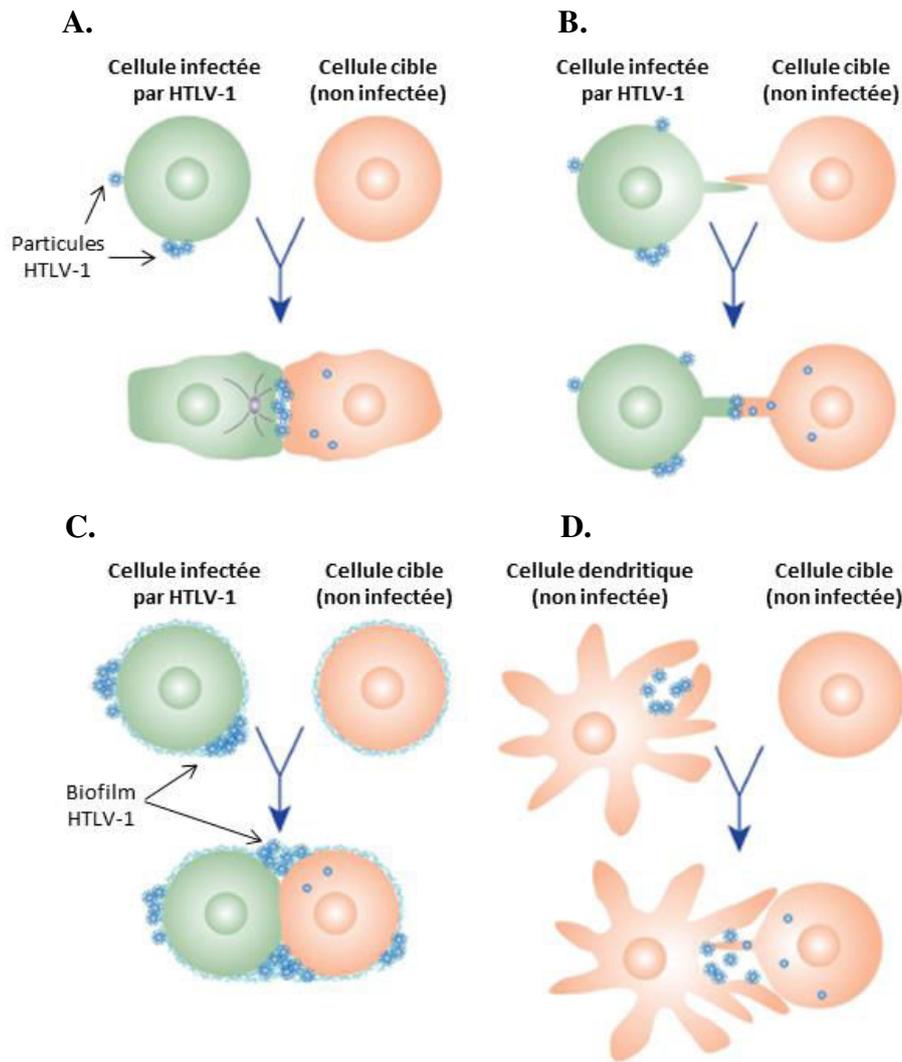


FIGURE 17 : Les différents modèles de transmission cellule-cellule du virus HTLV-1.

- A.** La synapse virologique. Lorsque la cellule infectée établit des contacts stables avec la cellule cible non infectée, via des interactions protéiques, la synapse virologique se forme. Le centre organisateur des microtubules (MTOC, symbolisé en gris) est alors réorganisé autour de la synapse dans la cellule infectée. Le bourgeonnement viral est localisé au niveau de la synapse, pour que les particules libérées se retrouvent dans la fente synaptique et puissent infecter directement la cellule cible, sans passer par le milieu extérieur.
- B.** Les conduits cellulaires. La cellule infectée par HTLV-1 peut transmettre le virus à la cellule cible grâce à des extensions transitoires de leurs membranes plasmiques, formant des conduits cellulaires. Les deux cellules entrent alors en contact au niveau de ces conduits mais également parfois, via d'autres contacts cellulaires (non illustré). Les particules virales passent ensuite dans ces conduits pour infecter la cellule cible.
- C.** Le biofilm HTLV-1. Après leur bourgeonnement à la surface de la cellule infectée, les particules HTLV-1 peuvent rester associées à la cellule, inclus dans une matrice formée essentiellement de protéines extracellulaires. Lors de contact avec la cellule cible, cette matrice est rapidement transférée à la surface de la cible, qui est ensuite infectée.
- D.** Infection en *trans* via les cellules dendritiques. Le virus HTLV-1 est capturé par les cellules dendritiques, qui le stockent provisoirement à leur surface puis, avant d'être elles-mêmes infectées, le transmettent à des lymphocytes T non infectés, dans le cadre de la présentation d'antigènes. L'interaction entre cellule dendritique et lymphocyte peut faire intervenir des extensions de membrane pour chacune des cellules. D'après (Pique and Jones, 2012).

II.2.3. Stratégies d'échappement au système immunitaire

Le virus HTLV-1 est responsable d'une infection persistante chez les personnes contaminées, qui s'explique par la mise en place de différents mécanismes viraux d'échappement au système immunitaire, à commencer par le développement de modes de transmission de cellule à cellule atypiques.

a) La transmission cellule-cellule du HTLV-1

Rapidement après sa découverte, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les particules HTLV-1 libres étaient peu infectieuses, suggérant que la transmission du virus s'effectuait par des contacts cellule-cellule (Miyamoto et al., 1984; Popovic et al., 1983; Yamamoto et al., 1982). Bien que ce dogme ait été remis en question récemment par plusieurs études mettant en évidence l'infection de cellules dendritiques par des particules HTLV-1 libres (Jones et al., 2008; Lambert et al., 2009), la transmission cellule-cellule semble être le mode d'infection préférentiel du virus. Toutefois, le mécanisme de cette transmission reste encore débattu, du fait de l'identification de plusieurs types de structures mises en jeu (Pique and Jones, 2012) (**FIGURE 17**).

Une étude en 2003 a ainsi démontré l'existence de conjugués entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte T non infecté, conduisant au transfert de protéines et d'ARN génomique viraux dans la cellule non infectée (Igakura et al., 2003). Par analogie avec d'autres types de jonctions spécialisées, comme les synapses neurologiques ou immunologiques, cette structure a été qualifiée de synapse virologique (**FIGURE 17A**). Cette synapse a par ailleurs été mise en évidence chez d'autres rétrovirus comme le virus de la leucémie murine (MLV, *Murine Leukemia Virus*) ou encore le HIV, dans le cadre de leur transmission (Jin et al., 2009a; Jolly et al., 2004) (**FIGURE 18**).

La formation de la synapse virologique est initiée par des contacts stables entre deux cellules, notamment via l'interaction des molécules ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) et LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) (Barnard et al., 2005). La protéine Taline, impliquée dans l'adhérence cellulaire, est également accumulée au niveau des zones de contact entre cellules et pourrait favoriser la formation de cette synapse (Igakura et al., 2003; Piguet and Sattentau, 2004) (**FIGURES 18A et 19**).

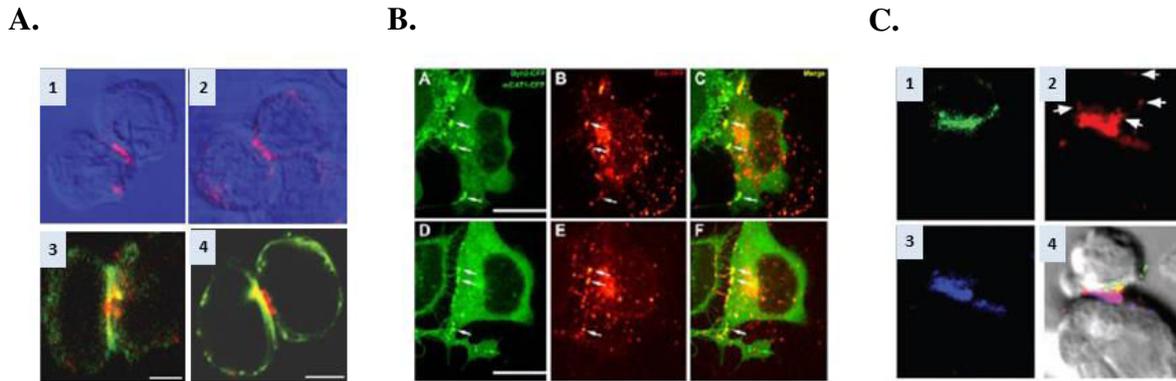


FIGURE 18 : La synapse virologique chez les rétrovirus.

- A. La synapse virologique HTLV-1. Les protéines virales Gag (1) et Env (2), marquées en rouge, sont polarisées au niveau des zones de contact cellule-cellule, tout comme la protéine cellulaire taline (3), marquée en vert. (4) Le MTOC est réorganisé et polarisé autour de la synapse à la suite de l'établissement de ces contacts (tubuline α cellulaire en vert et protéines Gag virales en rouge). D'après (Igakura et al., 2003).
- B. La synapse virologique MLV. (A à F) Les protéines Env virales, marquées en rouge et indiquées par les flèches blanches, se regroupent au niveau des zones de contact entre les cellules, avant d'être incorporées dans les virions néosynthétisés. D'après (Jin et al., 2009a).
- C. La synapse virologique HIV-1. Les marqueurs cellulaires CD4, en vert (1), et les protéines Env virales, en bleu (3), sont regroupés au niveau des contacts synaptiques. Les protéines Gag virales, marquées en rouge (2), sont recrutées au niveau de la synapse. Les flèches blanches indiquent les protéines Gag retrouvées dans la cellule cible, témoignant de son infection et du passage du virus. D'après (Jolly et al., 2004).

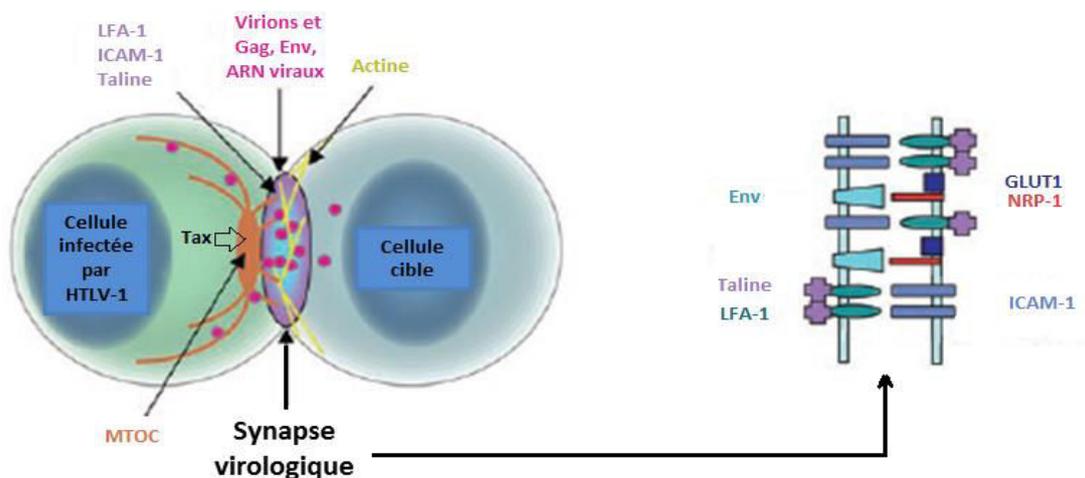


FIGURE 19 : Structure de la synapse virologique induite par l'infection HTLV-1.

Représentation schématique de la synapse virologique et de ses différents composants, formée lors d'une infection par HTLV-1. Les contacts stables établis entre les deux cellules, grâce notamment aux interactions entre les protéines ICAM-1 et LFA-1, sont à l'origine de la formation de la synapse. La protéine Taline est également impliquée dans ces interactions. Ces contacts cellulaires sont favorisés par l'expression de la protéine Tax dans la cellule infectée, activant entre autre l'expression du gène codant pour ICAM-1. L'établissement de ces contacts cellule-cellule induit la polymérisation du MTOC autour de la synapse. Les composants viraux Gag, Env et des ARN génomiques sont également transportés au niveau de la synapse, via les microtubules. Des virions bourgeonnent et sont ensuite libérés dans la fente synaptique, favorisant l'infection de la cellule cible. Il semble également que le cytosquelette, et notamment les filaments d'actine, soit mobilisé dans la cellule cible, en transportant les récepteurs des glycoprotéines de l'enveloppe viral, ainsi que des molécules d'adhérence (ICAM-1, LFA-1, Taline) au niveau de la synapse. D'après (Piguet and Sattentau, 2004).

Ces différents contacts cellulaires entraînent la polarisation du centre organisateur des microtubules (MTOC, *Microtubule-Organizing Center*) dans la cellule infectée, au niveau des zones de contact (Igakura et al., 2003; Nejmeddine et al., 2005) (**FIGURES 17A** et **19**). Les microtubules, et l'ensemble du cytosquelette, jouent donc un rôle essentiel dans la formation de la synapse virologique, puisqu'ils ont également été décrits comme impliqués dans le transport des protéines virales Gag et Env, ainsi que dans celui du génome ARN viral, au niveau des contacts cellule-cellule (Igakura et al., 2003).

D'autre part, la protéine Tax, exprimée dans les cellules infectées, contribue à la polymérisation du MTOC, et donc à la formation de la synapse virologique, en activant l'expression d'ICAM-1, dont l'engagement dans les interactions cellulaires est indispensable à la polymérisation des microtubules (Nejmeddine et al., 2009; Tanaka et al., 1995).

Dernièrement, une autre protéine virale, la protéine p8, a été identifiée comme favorisant les contacts cellule-cellule en augmentant le regroupement des protéines LFA-1 à la surface des lymphocytes infectés, facilitant donc les interactions entre LFA-1 et ICAM-1 (Van Prooyen et al., 2010).

L'analyse des synapses virologiques en tomographie électronique a permis de visualiser des particules HTLV-1 au niveau de la fente de cette structure, localisée entre les deux cellules, permettant ainsi un transfert efficace de ces virions, qui se situent à l'abri du milieu extérieur et du système immunitaire (Majorovits et al., 2008) (**FIGURE 20**).

La synapse virologique semble donc être un mécanisme efficace pour que le virus soit transmis directement à de nouveaux lymphocytes. Cependant, d'autres processus ont été mis en évidence dans la transmission cellule-cellule du HTLV-1.

Une étude récente a ainsi démontré l'existence de conduits cellulaires, permettant de transmettre le virus de la cellule infectée à la cellule cible (Van Prooyen et al., 2010) (**FIGURE 17B**). La protéine virale p8 a été décrite comme augmentant le nombre et la taille des conduits générés, ainsi que les contacts entre les cellules. Le passage de cette protéine p8 et du précurseur Gag a, en outre, été démontré au niveau de ces conduits, qui constituent un mode de transmission sûr pour le HTLV-1, l'empêchant en effet d'être confronté aux molécules du système immunitaire.

D'autres données ont prouvé que le virus pouvait se transmettre de cellule à cellule grâce à la formation d'un biofilm à la surface du lymphocyte infecté, qui est ensuite transmis au lymphocyte cible (Pais-Correia et al., 2010) (**FIGURE 17C**).

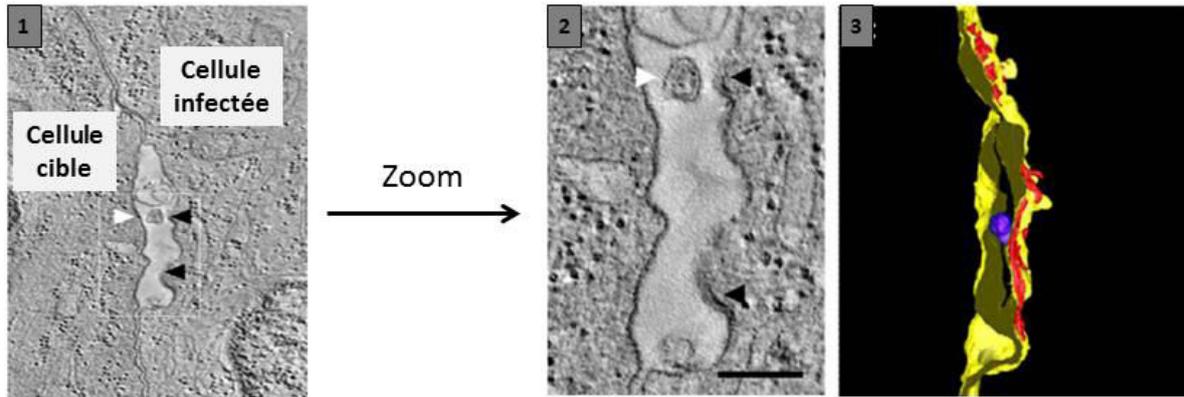


FIGURE 20 : Bourgeonnement et libération des virions HTLV-1 au niveau de la fente synaptique.

(1 et 2) Observation de la synapse virologique en tomographie électronique. Le virion présent dans la fente synaptique (d'une largeur d'environ 20nm) est indiqué par la flèche blanche, tandis que ceux en train de bourgeonner sont indiqués par les flèches noires. (3) Modélisation 3D de la synapse visualisée en (2), avec les membranes cellulaires représentées en jaune, l'enveloppe virale en bleue, le noyau des virions en rose, les protéines constituant ce noyau viral, en train de bourgeonner à la membrane, en rouge. D'après (Majorovits et al., 2008).

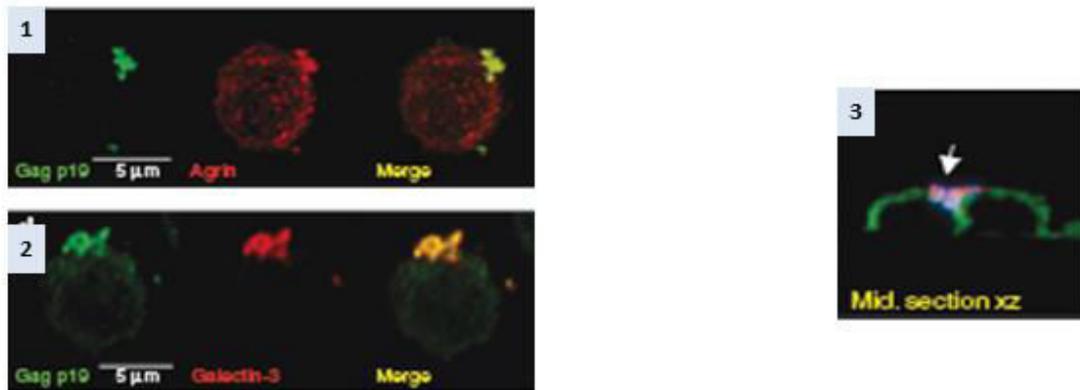


FIGURE 21 : Mise en évidence de biofilms HTLV-1 à la surface de lymphocytes T CD4⁺ infectés.

Observation des biofilms viraux et de leurs composants, situés à la surface de lymphocytes T CD4⁺, en microscopie confocale. (1 et 2) La protéine virale Gag, marquée en vert, est retrouvée dans les biofilms, témoignant de la présence du virus. Les protéines de la matrice extracellulaire agrine (1) et galectine-3 (2), marquées en rouge, composent également les biofilms et forment une matrice qui maintient les particules virales à la surface des cellules. (3) Lors de contact entre les cellules, le biofilm (symbolisé par la flèche blanche) est transmis à la cellule cible (la protéine concanavaline A, située sur la surface cellulaire, est marquée en vert et les composants viraux sont en rouge et bleu). D'après (Pais-Correia et al., 2010).

Ce biofilm est une structure enrichie en protéines de la matrice extracellulaire, riche en carbohydrates, qui est induite et réorganisée par HTLV-1 et dans laquelle se situent les particules virales (**FIGURE 21**). Les protéines galectine-3 et tétherine, présentes dans le biofilm, permettent de maintenir les amas de virus à la surface des lymphocytes.

Lors d'un contact, la cellule infectée transfère le biofilm viral à la cellule cible, qui est alors rapidement infectée. Cette matrice représente un autre mécanisme permettant aux HTLV-1 d'échapper au système immunitaire.

En plus d'être transmis entre les lymphocytes T, le virus HTLV-1 peut aussi passer d'une cellule dendritique infectée à un lymphocyte T CD4⁺, favorisé par les contacts établis entre ces deux cellules dans le cadre de la présentation d'antigènes (**FIGURE 17D**).

Cette infection peut avoir lieu en *cis*, correspondant à l'infection productive de la cellule dendritique dont les virions néosynthétisés pourront ensuite infecter le lymphocyte (Jones et al., 2008), ou en *trans*, où il y a seulement transfert des particules virales capturées par la cellule dendritique non infectée au lymphocyte (Jain et al., 2009; Jones et al., 2008). La protéine DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*) a été identifiée comme importante dans cette transmission en *trans* du HTLV-1.

Par ailleurs, l'expression de DC-SIGN sur des cellules dendritiques non infectées favorise la transmission du virus à ces cellules, via des lymphocytes T contaminés (Ceccaldi et al., 2006). Cette étude montre en outre des fusions entre les cellules infectées et les cellules cibles, qui ont aussi été décrites par d'autres équipes, et qui pourraient représenter un mécanisme favorisant la transmission cellule-cellule du HTLV-1 (Ceccaldi et al., 2006; Taylor et al., 2009).

L'ensemble des processus de transmission cellulaire du HTLV-1 qui viennent d'être décrits peuvent être employés tour à tour suivant les cellules infectées et suivant les interactions qu'elles établissent entre elles.

Ces modes de transmission cellule-cellule participent à la diversité des stratégies mises en place par le virus pour empêcher son élimination par le système immunitaire, mais restent toutefois limités aux stades précoces de l'infection. En effet, pour l'établissement de la persistance virale, HTLV-1 utilise une autre stratégie de propagation et d'échappement à la réponse immune, correspondant à l'expansion clonale.

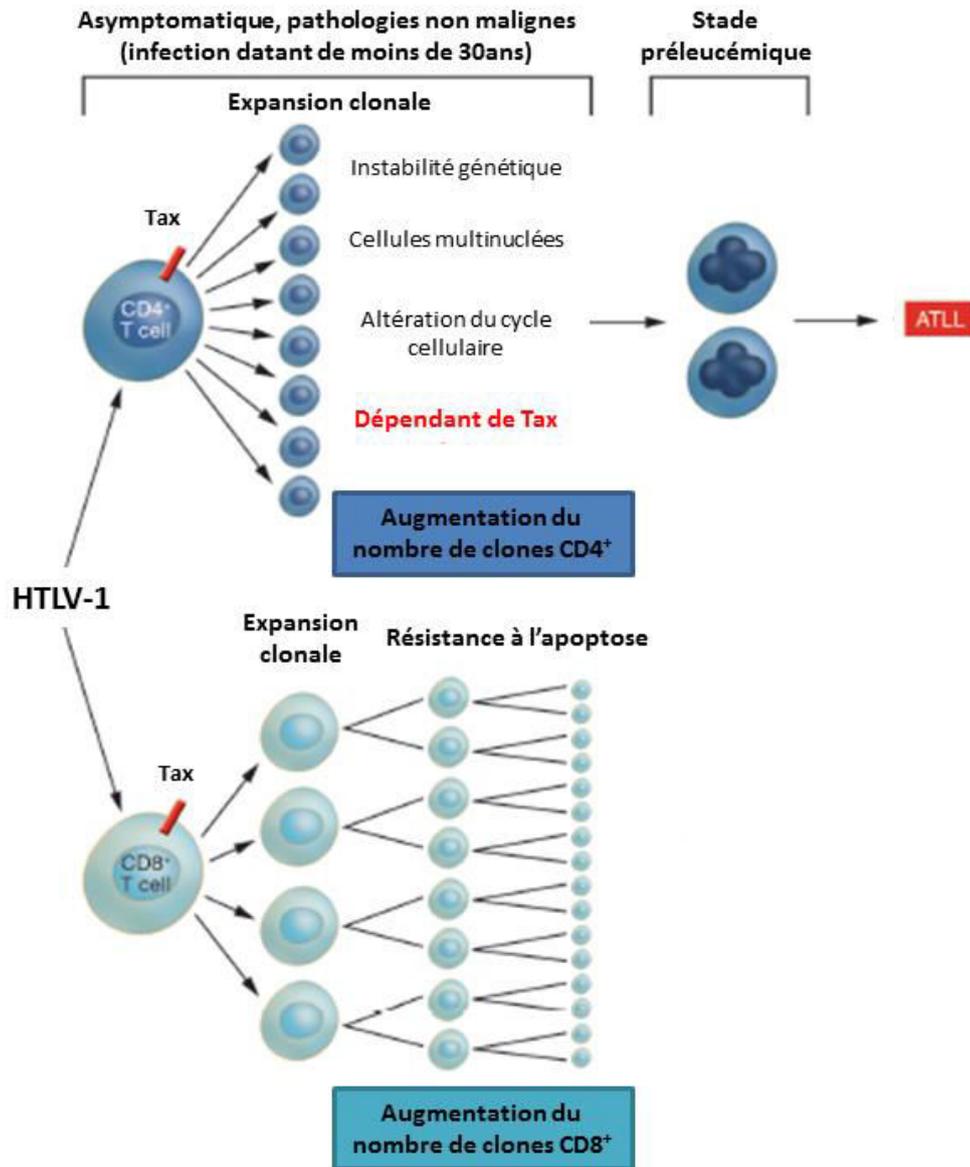


FIGURE 22 : Modèle d'expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ pouvant conduire au développement de pathologies, comme l'ATLL.

Après avoir infecté les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, le virus HTLV-1 se multiplie par expansion clonale dans ces cellules. Au niveau des lymphocytes T CD8⁺, cette expansion est possible grâce au blocage de l'apoptose induit par la protéine Tax virale, tandis que dans les lymphocytes T CD4⁺, Tax induit l'entrée des cellules en phase de réplication S du cycle cellulaire. Au cours du temps, les anomalies génomiques, favorisées par Tax, entraînent le début de la transformation des lymphocytes T CD4⁺, qui entrent dans une phase préleucémique, pouvant par la suite conduire au développement de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATLL). D'après (Semmes, 2006).

b) La multiplication clonale

Chez les personnes contaminées par HTLV-1, un grand nombre de clones de cellules infectées, possédant le même site d'intégration du génome proviral dans la chromatine cellulaire, a été retrouvé dans le sang périphérique, indiquant que ces clones sont issus d'une même cellule infectée au départ (Leclercq et al., 1998; Wattel et al., 1995; Zane et al., 2009). D'autres études ont montré que ces clones peuvent persister des années chez les individus (Cavrois et al., 1996, 1998; Etoh et al., 1997). Toutefois, le nombre de clones HTLV-1 différents, présents chez les personnes infectées depuis une longue période, est moins élevé que chez celles venant d'être contaminées (Tanaka et al., 2005).

Une étude récente, basée sur une nouvelle méthode d'estimation de la diversité, a évalué qu'il existait près de $6,2 \cdot 10^4$ clones différents chez un même individu infecté par HTLV-1, dont $2,9 \cdot 10^4$ en circulation (Laydon et al., 2014).

La présence de ces clones, associée à la faible variabilité génomique du HTLV-1 ainsi qu'à la faible production de particules virales, suggèrent que le virus se multiplie préférentiellement par réplication mitotique des cellules infectées, dans lesquelles l'ADN proviral est intégré au sein de la chromatine cellulaire (Cook et al., 2013; Wattel et al., 1996). Ainsi, le modèle actuel concernant la mise en place de la persistance virale lors d'une infection par HTLV-1 fait intervenir deux étapes : la première, située immédiatement après l'infection, pendant laquelle le virus se multiplie, produit de nouveaux virions qui se propagent par transmission cellule-cellule, entraînant le développement d'une infection polyclonale de lymphocytes T ; la deuxième, instaurée durant la phase chronique de l'infection, où le HTLV-1 se réplique essentiellement par expansion clonale. Ainsi, grâce à ce mode de multiplication, le virus reste à l'intérieur des cellules, ce qui lui permet d'échapper à une partie des acteurs de la réponse immune, comme les anticorps par exemple, et donc de persister dans l'organisme.

La réplication virale par expansion clonale concerne les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ infectés par HTLV-1. Des études ont montré que ce processus impliquait deux mécanismes distincts : d'une part l'induction du cycle cellulaire dans les lymphocytes T CD4⁺ (passage des cellules en phase de réplication S) et d'autre part, le blocage de l'apoptose dans les lymphocytes T CD8⁺ (Sibon et al., 2006; Zane et al., 2009) (**FIGURE 22**).

Cette résistance des lymphocytes T CD8⁺ infectés à la mort cellulaire a été corrélée à la surexpression du gène anti-apoptotique *c-IAP2* (*cellular Inhibitor of Apoptosis 2*), via l'activation de la voie NF- κ B par Tax (Zane et al., 2010).

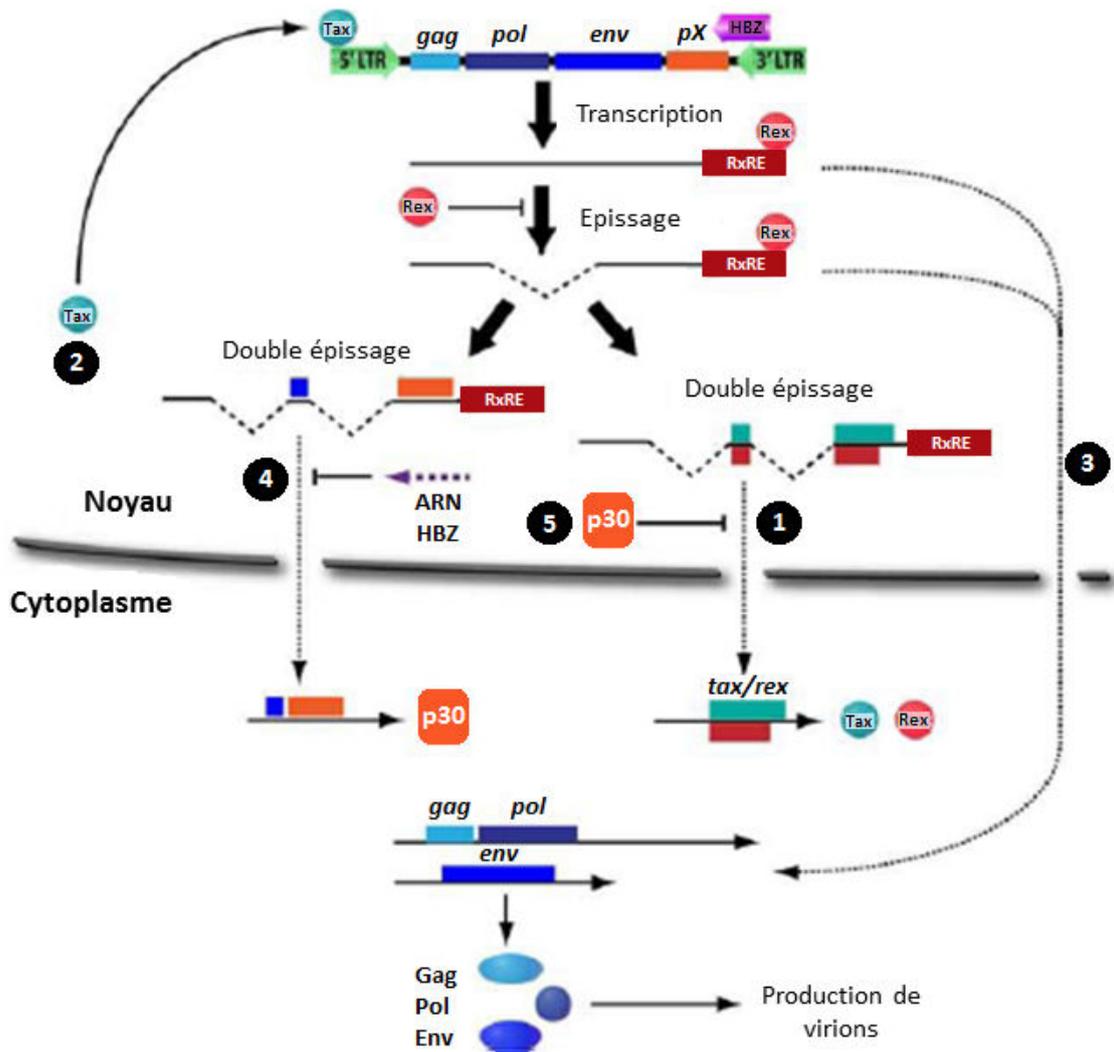


FIGURE 23 : Fonction répressive de la protéine auxiliaire p30 sur l'expression du génome HTLV-1.

Représentation schématique du contrôle de l'expression du génome proviral, exercé par les protéines Tax, Rex et p30. (1) Les ARNm doublement épissés viraux sont exportés dans le cytoplasme pour donner les protéines Tax et Rex. (2) La protéine Tax est localisée au niveau du noyau pour activer la transcription des gènes viraux à partir du LTR 5'. (3) Dans le noyau, la protéine Rex se lie aux séquences RxRE situées en 3' des ARNm viraux et les exporte dans le cytoplasme, inhibant leur épissage. (4) Certains ARNm viraux sont toutefois épissés, comme les ARNm doublement épissés de p30 ou ceux de Tax/Rex. L'ARNm p30 peut être inhibé par l'ARNm antisens HBZ (Choudhary and Ratner, 2011). (5) Une fois produite, la protéine p30 migre dans le noyau et interagit avec les domaines p30RE, créés spécifiquement dans les ARNm doublement épissés Tax/Rex, empêchant leur export dans le cytoplasme. De plus, p30 interagit avec la protéine Rex via son domaine RexBD pour inhiber l'export des ARNm viraux, dont les ARNm Tax/Rex. En entravant la synthèse de la protéine Tax, p30 diminue la transcription du génome proviral. D'après (Edwards et al., 2011).

Par ailleurs, l'accumulation d'altérations génomiques induites par Tax dans les clones de lymphocytes T CD4⁺ peut conduire, au cours du temps, au développement d'un ATLL (Semmes, 2006) (**FIGURE 22**). Toutefois, contrairement à ce qui était communément supposé, des données récentes ont montré que la prolifération oligoclonale ne contribuait pas en soi à la transformation maligne des lymphocytes T infectés ou à l'apparition d'autres pathologies liées à l'infection par HTLV-1 (Bangham et al., 2014; Cook et al., 2014).

c) La répression de l'expression virale

Malgré la faible production de particules HTLV-1 et la stratégie d'expansion clonale permettant au virus de rester à l'intérieur des cellules infectées, ces dernières exposent à leur surface des antigènes viraux qui stimulent la réponse immune anti-HTLV-1. La protéine auxiliaire p12 permet de limiter l'immunogénicité de ces cellules, en réduisant l'expression de leurs complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), qui présentent à leurs surfaces des peptides viraux pouvant être reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ (Johnson et al., 2001). Toutefois, ce mécanisme semble insuffisant pour favoriser la persistance virale. Le virus HTLV-1 a donc développé une stratégie de répression de l'expression de ses gènes, dans les cellules qu'il infecte.

Tax étant la protéine virale la plus immunogène (Sagar et al., 2014) et, en outre, responsable de la forte activation de la transcription des gènes proviraux, elle est particulièrement ciblée par la répression, qui est réalisée par d'autres protéines virales.

Ainsi, la protéine auxiliaire p30 a été décrite comme réprimant l'expression de Tax en empêchant l'export dans le cytoplasme des ARNm Tax/Rex néosynthétisés (Ghorbel et al., 2006; Nicot et al., 2004) (**FIGURE 23**). En effet, p30, qui est localisée dans le noyau et les nucléoles, peut interagir spécifiquement avec ces ARNm doublement épissés au niveau de leurs domaines p30RE (*p30 mRNA-Responsive Element*) (Sinha-Datta et al., 2007).

Par ailleurs, p30 possède un domaine RexBD (*Rex-Binding Domain*) qui lui permet de se lier directement à la protéine Rex, inhibant alors sa fonction dans l'export des ARNm viraux (Baydoun et al., 2007).

En diminuant l'expression des protéines régulatrices virales, et plus particulièrement celle de Tax, p30 contribue au passage de la phase de réplication virale à la phase de latence, favorisant ainsi l'échappement du HTLV-1 au système immunitaire et sa persistance.

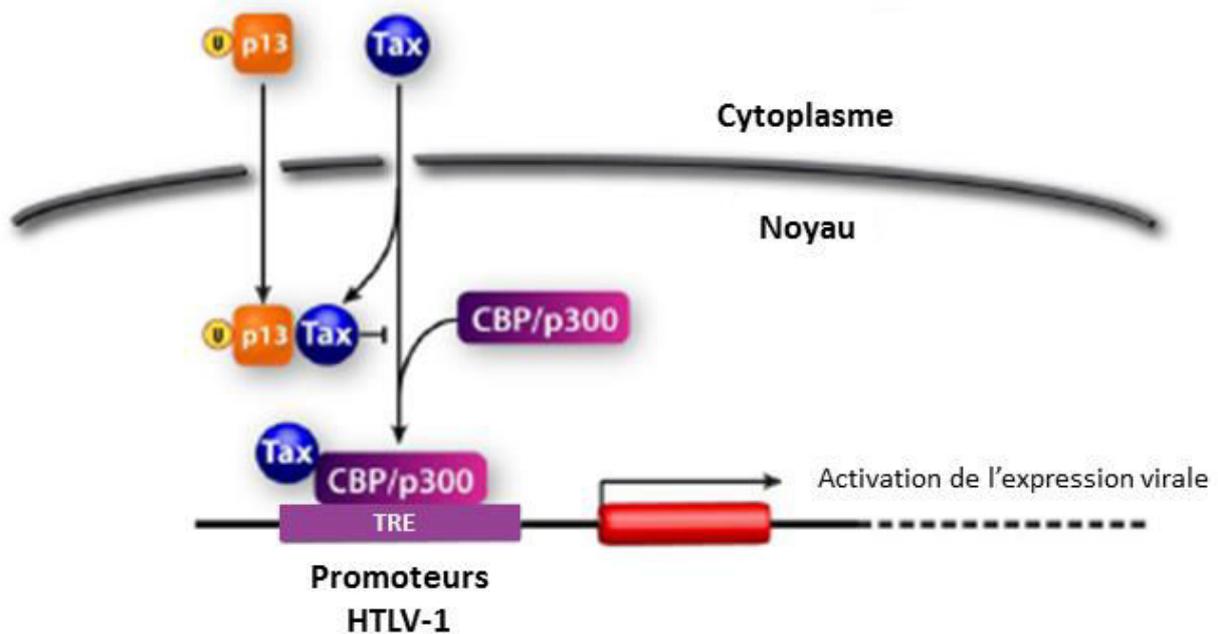


FIGURE 24 : Fonction répressive de la protéine auxiliaire p13 sur l'expression du génome HTLV-1.

Représentation schématique de l'action inhibitrice de la protéine p13 sur l'expression des gènes viraux. Tax induit l'ubiquitinylation de p13 qui migre ensuite dans le noyau, où elle interagit avec Tax. Cette interaction empêche la formation du complexe Tax/CBP/p300 permettant d'activer les promoteurs viraux. La transcription des gènes viraux est alors diminuée. D'après (Edwards et al., 2011).

D'autre part, la protéine p30 agit également au niveau de l'activation de la transcription du génome proviral induite par Tax, en interagissant avec le facteur CBP/p300, dissociant alors le complexe CREB/Tax/CBP/p300, formé au niveau des séquences TRE (*Tax-Responsive Element*) du LTR proviral (mécanisme détaillé dans la partie III.1.2.a.). Cette interaction compétitive entraîne la répression de l'activation des promoteurs viraux et par conséquent, l'inhibition de la transcription du génome HTLV-1 (Michael et al., 2006; Zhang et al., 2001). De façon intéressante, la faible variabilité du gène codant pour p30, ainsi que les similitudes entre les protéines p30 du HTLV-1 et p28 du HTLV-2, laissent à penser qu'il existe également un mécanisme de répression de l'expression génique, contrôlant la réplication du virus HTLV-2 (Ciminale et al., 1995; Yamamoto et al., 2008; Younis et al., 2004).

Par ailleurs, l'implication de la protéine auxiliaire p13 dans la répression de la réplication du HTLV-1 a aussi été mise en évidence. En effet, p13, qui est principalement située au niveau de la membrane interne des mitochondries (Ciminale et al., 1999; D'Agostino et al., 2002), peut partiellement être relocalisée dans le noyau, suite à son ubiquitinylation induite par la protéine Tax (**FIGURE 24**). La délocalisation nucléaire de p13 lui permet d'interagir avec Tax et ainsi d'empêcher sa liaison au facteur CBP/p300 (Andresen et al., 2011). Cette diminution de la formation du complexe Tax/CBP/p300 réduit l'activation de la transcription du génome proviral induite par Tax, favorisant la transition vers la phase de latence. En outre, cette répression souligne l'existence de mécanisme de contrôle établis par Tax pour réguler sa propre expression.

Une troisième protéine virale, la protéine antisens HBZ, a été montrée comme étant impliquée dans la répression de l'expression d'HTLV-1. Cette protéine a notamment été décrite comme induisant l'expression de l'ubiquitine ligase PDLIM2 (*PDZ and LIM domain protein 2*), qui est impliquée dans la dégradation de Tax, via le protéasome cellulaire (Yan et al., 2009a; Zhao et al., 2009).

En outre, comme cela a été expliqué précédemment (partie II.1.2.c.), la protéine HBZ est capable d'interagir avec les protéines CREB, CREB-2 et CBP/p300, empêchant ainsi leurs recrutements par Tax et l'activation des promoteurs viraux au niveau du LTR 5' (Gaudray et al., 2002; Lemasson et al., 2007). En parallèle, HBZ peut activer sa propre transcription à partir du LTR 3', via les facteurs cellulaires JunD et Sp1, capables de se fixer aux sites de liaison à Sp1, situés au niveau de la région U5 du LTR 3' (Gazon et al., 2012; Yoshida et al., 2008).

Ainsi, HBZ favorise l'établissement de la latence et de l'infection chronique, en inhibant la transcription virale dépendante de Tax et en stimulant sa propre expression (Barbeau and Mesnard, 2015).

Des expériences *in vivo* chez des lapins infectés par HTLV-1 a confirmé ce modèle, ainsi que l'importance de l'expression d'HBZ pour la survie des cellules infectées, en montrant que la transcription sens à partir du LTR 5' était élevée immédiatement après l'infection puis décroissait au fil du temps, tandis que la transcription antisens à partir du LTR 3' suivait une évolution inverse, en augmentant avec le temps (Li et al., 2009).

Le rôle de la protéine HBZ dans la répression de l'expression des gènes viraux sens est appuyé par la présence de mutations, induites par le facteur de restriction APOBEC3G (*Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G*), dans tous les gènes proviraux, à l'exception d'HBZ, empêchant la production des protéines virales ou entraînant la synthèse de protéines tronquée (Fan et al., 2010). Par ailleurs, dans les cellules ATLL, les LTR 5' sont souvent hyperméthylés au niveau des îlots CpG ou éliminés, provoquant l'inhibition de la transcription des gènes sens, alors que le LTR 3' reste toujours intact et fonctionnel (Cook et al., 2013).

En supprimant l'expression des gènes viraux sens, HBZ réduit donc l'immunogénicité des cellules infectées. Par ailleurs, HBZ est capable d'activer la prolifération des lymphocytes T contaminés, indépendamment du facteur de croissance interleukine 2 (IL-2), augmentant ainsi la charge provirale et contribuant à la persistance du HTLV-1 *in vivo* (Satou et al., 2006). Récemment, une étude a démontré que le transcrit antisens lui-même activait constitutivement la voie NF- κ B dans les cellules ATLL, qui est une voie impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Kinpara et al., 2014). La protéine antisens HBZ a donc une place centrale dans la répression de l'expression du génome proviral, permettant au virus d'échapper à son élimination par le système immunitaire, ainsi que dans la persistance virale.

A travers ses différentes stratégies, le virus HTLV-1 peut donc contourner les mécanismes de la réponse immune. Il a par ailleurs développé des processus lui permettant de contrer directement ces mécanismes, et notamment ceux de la réponse immune innée (Journo and Mahieux, 2011). En effet, une diminution du nombre de cellules dendritiques, de monocytes et de cellules NK (*Natural Killer*) ou iNKT a été constatée chez les personnes infectées par HTLV-1, ainsi qu'une altération de leurs fonctions (Azakami et al., 2009; Hishizawa et al., 2004; Yu et al., 1991).

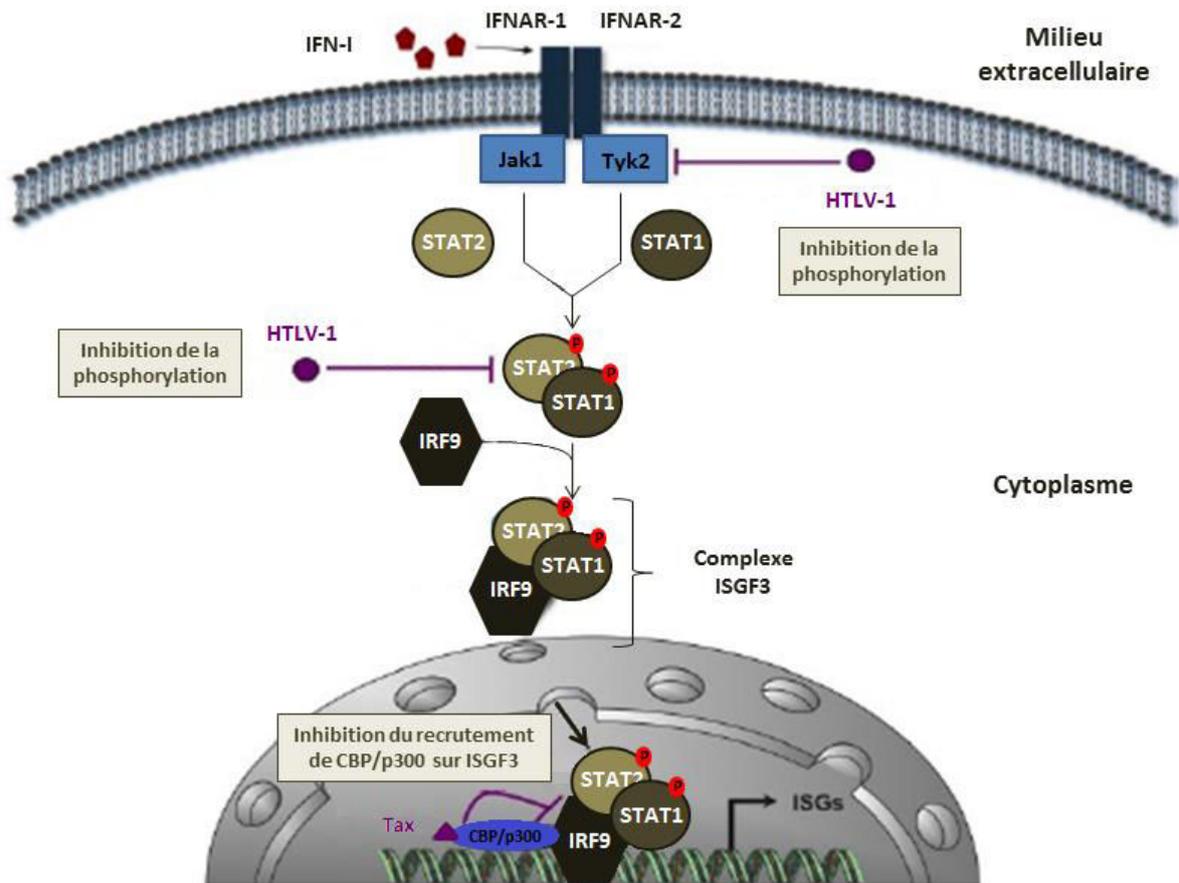


FIGURE 25 : Inhibition de la voie de signalisation des IFN-I par le virus HTLV-1.

Représentation schématique de la voie de signalisation des IFN de type I (α et β). Après fixation des IFN-I sur leurs récepteurs, IFNAR-1 et 2, les kinases Jak1 et Tyk2 sont activées et vont phosphoryler les facteurs STAT1 et STAT2 qui s'associent alors en hétérodimères. La protéine IRF9 se lie à ces hétérodimères, formant le complexe ISGF3, qui migre ensuite dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles (ISG), impliqués dans la réponse antivirale, en recrutant les co-activateurs CBP/p300. Le virus HTLV-1 bloque cette voie des IFN-I en différents endroits : au niveau des protéines Jak1, Tyk2, STAT1 et STAT2 en inhibant leur phosphorylation afin d'éviter leur activation et au niveau du complexe ISGF3, en inhibant le recrutement de CBP/p300 par STAT2, empêchant l'activation de la transcription des gènes ISG. La protéine Tax virale a été mise en jeu dans l'activation de SOCS1, qui inhibe la phosphorylation de Jak1 et STAT1, ainsi que dans le recrutement compétitif de CBP/p300. D'après (Journo and Mahieux, 2011).

D'autre part, le virus HTLV-1 inhibe la production d'IFN (*Interferon*) de type I (Fenizia et al., 2014; Olié et al., 2010), majoritairement synthétisé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, et altère la voie de signalisation cellulaire des IFN-I, empêchant les cellules d'activer leurs défenses antivirales (Journo and Mahieux, 2011).

Il a ainsi été montré que les cellules infectées par HTLV-1 expriment toujours les récepteurs aux IFN-I, appelés IFNAR (*IFN-Alpha/beta Receptor*), mais que l'infection diminue la phosphorylation de la Tyrosine kinase 2 (Tyk2) et du facteur STAT2, impliqués dans la voie des IFN-I (Feng and Ratner, 2008) (**FIGURE 25**). D'autres données mettent également en évidence l'activation de SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) par la protéine virale Tax, qui inhibe ensuite la phosphorylation des protéines JAK1 (*Janus Kinase 1*) et STAT1 (Olié et al., 2010) (**FIGURE 25**). Enfin, l'interaction de Tax avec les co-activateurs cellulaires CBP/p300 empêche leur recrutement par le facteur STAT2 au niveau du complexe ISGF3 (*IFN Stimulated Gene Factor 3*). Ce complexe, composé des protéines IRF9 (*IFN Regulatory Factor 9*), STAT1 et STAT2 phosphorylées, ne peut alors pas activer la transcription des gènes ISG, cibles de la voie de signalisation des IFN-I (Zhang et al., 2008) (**FIGURE 25**).

Le virus HTLV-1 a donc développé toute une variété de stratégies, lui permettant d'éviter son élimination par le système immunitaire et de persister dans l'organisme. Ces mécanismes aboutissent à l'établissement d'une infection chronique, pouvant conduire, avec le temps, à l'apparition de pathologies graves et invalidantes, dont l'issue peut être fatale.

II.3. Les pathologies liées à l'infection par HTLV-1

De nombreuses maladies ont été associées à HTLV-1, avec toutefois des degrés d'association très variables (**TABLEAU 1**). Toutes ces pathologies sont rares car elles ne sont retrouvées que chez 2 à 10% des personnes infectées (Mahieux, 2011).

II.3.1. Leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL)

a) Tableau clinique

La leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte ou ATLL (*Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*) est une prolifération maligne et agressive de lymphocytes T CD4⁺ activés, qui touche majoritairement les adultes et survient 40 à 60 ans après l'infection initiale (Yamaguchi and Watanabe, 2002).

Maladies	Association
ADULTE	
• Leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL)	+++
• Paraparésie spastique tropicale/Myélopathie Associée au HTLV-1 (TSP/HAM)	+++
• Uvéite intermédiaire de l'adulte jeune (<i>Japon/Caraïbe</i>)	+++
• Dermate infectieuse (<i>rare</i>)	+++
• Polymyosite, myosite à inclusion	+++
• Arthrite	+
• Syndrome de Sjögren	+
ENFANT	
• Dermate infectieuse (<i>Jamaïque/Brésil/Afrique noire</i>)	+++
• TSP/HAM (<i>rare</i>)	+++
• ATLL (<i>très rare</i>)	+++
+++ : association causale prouvée	
++ : association probable	
+ : association possible dans certains cas	

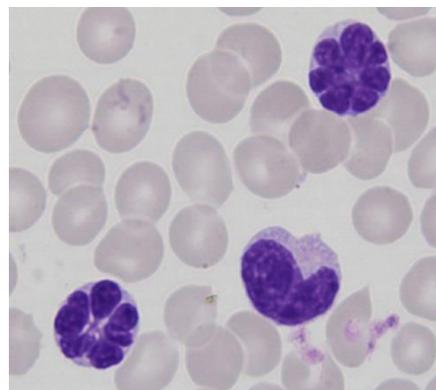


TABLEAU 1 : Maladies associées à HTLV-1.

FIGURE 26 : Cellules leucémiques en « fleur ».

La force de l'association représentée est basée sur des arguments épidémiologiques et/ou moléculaires et/ou expérimentaux (modèles animaux) et/ou iatrogènes. D'après (Gessain, 2011).

Observation de lymphocytes T leucémiques dans le sang périphérique de patients ATLL, caractérisés par leur morphologie en forme de « fleur » avec un noyau convoluté. D'après (Matsuoka, 2005).

	Indolente	Chronique	Lymphome	Aiguë
Proportion de cas	5%	20%	20%	55%
Médiane de survie	/	24 mois	10 mois	6 mois
Survie à 4 ans	66%	27%	6%	5%
SYMPTOMES				
• % de LT matures anormaux dans le sang périphérique	>5%	>5%	<1%	>5%
• Hyperlymphocytose (>4,10 ⁹ lymphocytes/L)	Non	Oui (>3,5,10 ⁹ /L)	Non	Oui
• Hypercalcémie ([Ca ²⁺]>2,74mmol/L)	Non	Non	Fréquente	Fréquente
• Lymphadénopathies	Non	Possible	Oui	Oui
• Atteinte hépatique	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
• Atteinte splénique	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
• Atteinte du système nerveux central	Non	Non	Possible	Possible
• Atteinte osseuse	Non	Non	Possible	Possible
• Atteinte gastro-intestinale	Non	Non	Possible	Possible
• Effusion pleurale	Non	Non	Possible	Possible
• Lésion pulmonaire	Possible	Possible	Possible	Possible
• Lésion cutanée	Possible	Possible	Fréquente	Fréquente

TABLEAU 2 : Les différentes formes cliniques d'ATLL et leurs caractéristiques.

Les formes aiguës et lymphomes (ou lymphomateuses) sont les plus agressives et associées à de nombreux symptômes de mauvais pronostics. Les formes chroniques et indolentes sont associées à moins d'atteintes et à un meilleur pronostic, bien qu'également fatales. D'après (Gessain, 2011; Shimoyama, 1991).

C'est une maladie assez rare puisqu'elle concerne moins de 5% des personnes infectées par HTLV-1. Toutefois, l'ATLL est particulièrement fréquente dans les zones de forte endémie HTLV-1, comme au Japon, où plus de 700 cas sont diagnostiqués chaque année (Arisawa et al., 2000). Les facteurs de risque de développement d'un ATLL chez les sujets infectés, ainsi que les déterminants de la progression de la maladie sont encore mal connus, mais il semble que cette pathologie apparait essentiellement suite à une transmission verticale par allaitement durant l'enfance et qu'elle affecte plus particulièrement les hommes que les femmes (Ishitsuka and Tamura, 2014).

Il existe plusieurs formes cliniques d'ATLL, qui ont été distinguées en fonction des symptômes répertoriés chez les malades : les formes leucémiques, lymphomateuses, chroniques et enfin, indolentes (Shimoyama, 1991) (**TABLEAU 2**).

Les formes leucémiques et lymphomateuses sont des formes aiguës qui sont les plus agressives, avec une médiane de survie de l'ordre de six mois. Elles se traduisent, du point de vue clinique, par la survenue d'adénopathies périphériques, associées fréquemment à une hépatosplénomégalie, à une hypercalcémie ainsi qu'à des lésions cutanées variées, entraînant un mauvais pronostic vital (Qayyum and Choi, 2014; Tokura et al., 2014). Ces symptômes peuvent également s'accompagner de manifestations neurologiques, gastro-intestinales, osseuses ou encore pulmonaires, aggravant le pronostic (**TABLEAU 2**).

Dans les formes leucémiques, il existe une hyperlymphocytose T, caractérisée par la présence de nombreuses cellules leucémiques dans le sang périphérique des malades. Ces cellules correspondent à des lymphocytes T anormaux possédant un grand nombre de marqueurs d'activation à leur surface, ainsi qu'une morphologie interne atypique et parfaitement reconnaissable, en forme de fleur, qui s'explique par la présence d'un noyau convoluté, dans lequel la chromatine est condensée et les nucléoles sont petits voir absents (Matsuoka, 2005) (**FIGURE 26**).

Dans les formes lymphomateuses, les cellules leucémiques envahissent les organes lymphoïdes et sont responsables de lymphomes T à cellules pléomorphes (Gessain, 2011).

Les formes chroniques et indolentes sont de meilleurs pronostics. En effet, la forme chronique a une évolution lente avec une hyperlymphocytose T, sans hypercalcémie et avec une atteinte limitée au niveau ganglionnaire, hépatosplénique et cutanée (**TABLEAU 2**). La médiane de survie des malades est d'environ 24 mois, bien qu'ils peuvent évoluer vers une forme aiguë de plus mauvais pronostic (Goncalves et al., 2010).

Les formes indolentes sont plus rares et se caractérisent par l'absence d'hyperlymphocytose, contrairement aux autres types d'ATLL, ainsi que par de fréquentes lésions cutanées (**TABLEAU 2**). Ces formes indolentes peuvent évoluer vers des états chroniques ou aigus.

Un cinquième type d'ATLL, appelé tumeur primaire cutanée, a été mis en évidence plus récemment et correspond au développement de tumeurs cutanées, sans apparition d'autres symptômes observés dans les quatre formes précédentes (Bittencourt et al., 2007; Lyra-da-Silva et al., 2012).

Les complications infectieuses des patients ATLL sont fréquentes (Matsuoka and Jeang, 2011). En effet, comme cela a été expliqué précédemment (fin de la partie II.2.3.), l'infection par HTLV-1 altère les cellules du système immunitaire et leurs fonctionnements conduisant parfois à l'apparition de maladies opportunistes. Les sujets ATLL peuvent notamment développer des pneumonies à *Pneumocystis carinii*, ou des infections par *Strongyloides stercoralis*, qui doivent être dépistées et traitées rapidement car le parasite peut se diffuser dans l'organisme et entraîner une anguillulose sévère (Stewart et al., 2011). De façon intéressante, l'infection par *Strongyloides stercoralis* chez des personnes contaminées par HTLV-1 semble favoriser l'apparition de l'ATLL (Gabet et al., 2000; Nakada et al., 1987).

Le diagnostic de cette leucémie est relativement facile pour les formes aiguës mais beaucoup plus compliqué pour les formes chroniques et indolentes (Tsukasaki et al., 2009). La sérologie HTLV-1, l'origine du patient, la présence de cellules T leucémiques et l'hypercalcémie sont des arguments en faveur du diagnostic de l'ATLL. Cependant, la confirmation de la maladie n'est établie que lors de la détection d'ADN proviral dans la chromatine des cellules tumorales.

Il est enfin important de souligner qu'aucun cas de leucémie/lymphome à cellule T de l'adulte n'a été identifié chez les sujets infectés par HTLV-2. Bien que ce virus soit capable de transformer des lymphocytes T CD8⁺ *in vitro* et qu'il ait été isolé au départ chez un malade atteint de leucémie T à tricholeucocytes, il n'a depuis jamais été associé à une maladie lymphoproliférative (Feuer and Green, 2005). Les divergences au niveau des protéines auxiliaires et régulatrices, notamment au niveau de Tax, entre les virus HTLV-1 et HTLV-2 sont des éléments avancés pour expliquer leur différence de pathogénicité. En effet, comme cela sera décrit par la suite (partie III.1.1.), Tax1 a entre autre un pouvoir activateur fort sur les voies NF-κB, contrôlant divers processus cellulaires dont la prolifération, contrairement à la protéine Tax2 d'HTLV-2, qui ne peut activer qu'une partie de ces voies (Qu and Xiao, 2011).

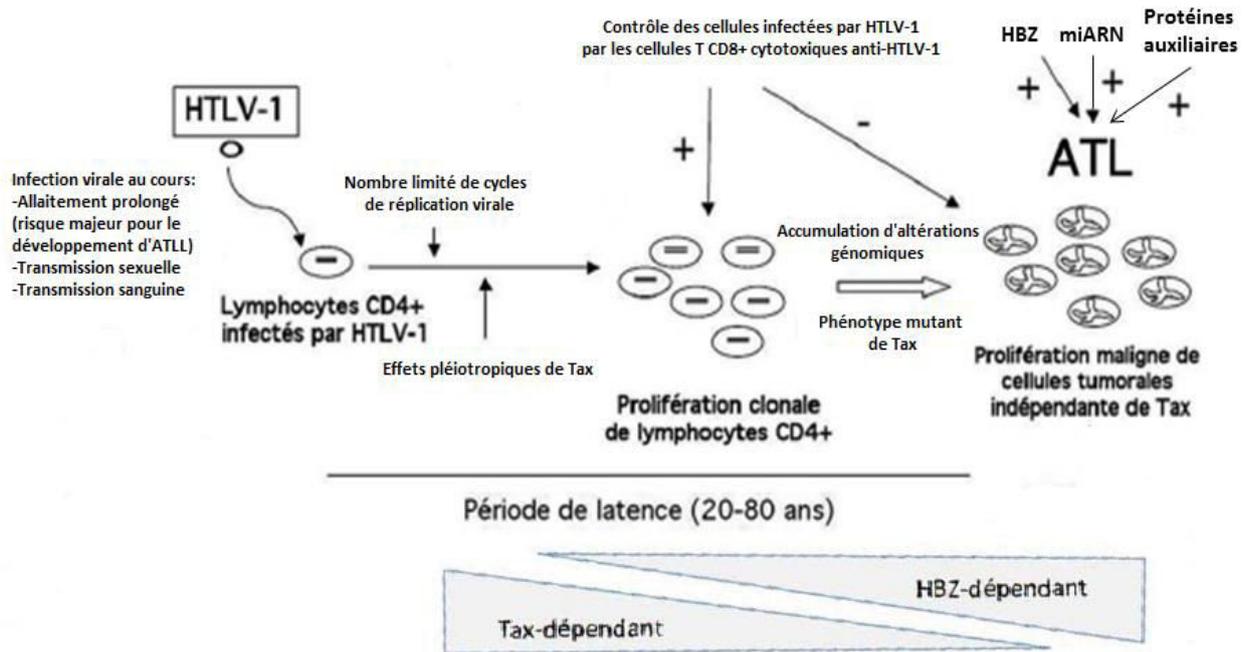


FIGURE 27 : Modèle de développement de l'ATLL associé à HTLV-1.

Ce modèle, basé sur l'ensemble des données disponibles actuellement, comporte trois étapes majeures : la primo-infection lors d'un allaitement prolongé majoritairement, suivie de la prolifération clonale des lymphocytes infectés, dont les lymphocytes T CD4⁺, induite par la protéine Tax, et enfin l'accumulation d'altérations génomiques dans l'ADN des clones sélectionnés, due à leur multiplication incontrôlée ainsi qu'à l'action de la protéine Tax, aboutissant à l'émergence de cellules leucémiques. La protéine HBZ participe au maintien et à la prolifération de ces lymphocytes T CD4⁺ transformés. D'après (Gessain, 2011).

b) Pathogenèse

Les mécanismes à l'origine de la transformation cellulaire, conduisant à l'apparition de l'ATLL, restent encore mal connus. Cependant, grâce aux nombreuses recherches menées ces dernières années, un modèle de développement de cette carcinogenèse a pu être établi, comprenant trois grandes étapes successives (Gessain, 2011) (**FIGURE 27**).

La première étape correspond à la primo-infection des individus par HTLV-1, essentiellement lors d'un allaitement prolongé durant l'enfance (dans plus de 95% des cas). Le virus va alors se multiplier et produire de nouveaux virions, favorisant ainsi le développement d'une infection polyclonale de lymphocytes T.

Intervient ensuite la deuxième étape qui est l'expansion clonale de ces cellules T infectés, et notamment celle des lymphocytes T CD4⁺, induit principalement par la protéine virale Tax (**FIGURE 27**). En effet, comme cela sera détaillé par la suite (partie III.1.), Tax peut détourner différentes protéines cellulaires impliquées dans de nombreux processus, dont la prolifération, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose (Matsuoka and Jeang, 2011). Ainsi, Tax favorise l'entrée des lymphocytes T CD4⁺ en phase de réplication S tandis qu'elle bloque l'apoptose des T CD8⁺ infectés, permettant la multiplication clonale de ces cellules immortalisées. Il existe certainement un contrôle de l'expansion de ces clones, en particulier de ceux exprimant la protéine Tax, très immunogène, exercé par la réponse immune cytotoxique.

Au final, les clones sélectionnés subissent des altérations génomiques, liées à leur multiplication incontrôlée ainsi qu'à la protéine Tax, qui favorise ces anomalies (Majone et al., 1993; Matsuoka and Jeang, 2011) (**FIGURE 27**). Cette troisième étape, durant laquelle s'accumulent les altérations, contribue à l'émergence de clones de lymphocytes T CD4⁺ transformés, conduisant avec le temps au développement de l'ATLL.

Comme cela a été expliqué auparavant (partie II.2.3.c.), la protéine HBZ en favorisant la persistance virale, via la répression du génome HTLV-1 et l'induction de la prolifération des lymphocytes T infectés, joue un rôle central dans l'émergence des clones transformés, ainsi que dans leur maintien. Ces cellules leucémiques expriment d'ailleurs constamment HBZ mais perdent l'expression de Tax dans plus de 50% des cas, acquérant donc une prolifération indépendante de Tax (Satou et al., 2006; Takeda et al., 2004). Les protéines auxiliaires, comme p30 et p13, importantes pour l'entrée en latence du virus, pourraient également participer à ce processus de transformation (Edwards et al., 2011). Enfin dernièrement, la dérégulation des miARN cellulaires lors de l'infection a été décrite comme pouvant contribuer à l'apparition des cellules leucémiques (Ruggero et al., 2010; Yamagishi and Watanabe, 2012).

Le modèle proposé correspond à ce qui est observé cliniquement chez les sujets ATLL. En effet, il semble qu'il s'écoule un temps très long entre le moment de la primo-infection et celui de l'apparition de la pathologie, correspondant à la période de 40 à 60 ans constatée chez les malades. Par ailleurs, le processus complexe et sélectif de la transformation cellulaire semble ne pas aboutir dans tous les cas d'infection, ce qui explique que seul 5% des personnes contaminées développent l'ATLL.

Une meilleure compréhension du mécanisme pathologique est donc essentielle pour la mise au point de thérapies ciblées et efficaces, permettant de retarder et de lutter contre la maladie.

c) Traitements

Les leucémies et lymphomes qui ne sont pas d'origine virale sont principalement traités par polychimiothérapie. Ce traitement s'avère assez inefficace dans le cadre de l'ATLL et n'entraîne que peu de rémission (Tsukasaki et al., 2009). En effet, dans les formes leucémiques et lymphomateuses, la polychimiothérapie ne permet d'obtenir que 10% de survie à quatre ans, avec une médiane de survie des patients traités de l'ordre de six mois.

Cette faible efficacité des molécules chimiques classiques est en partie due à la résistance intrinsèque des cellules leucémiques ATLL, ainsi qu'à l'immunodépression viro-induite.

Dernièrement, des recherches basées sur l'identification de nouvelles molécules naturelles, aux pouvoirs anti-HTLV-1, ont permis de découvrir plusieurs alcaloïdes, issus d'une plante appelée *Tylophora indica*, possédant une activité contre les cellules infectées par HTLV-1 et qui pourraient donc être de potentiels candidats chimiothérapeutiques dans le cadre du traitement de l'ATLL (Nakano et al., 2015).

Des stratégies d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques ont aussi été développées pour parer à l'inefficacité de la polychimiothérapie. Ces greffes donnent des résultats intéressants, notamment chez les patients atteints de formes graves d'ATLL, avec une nette réduction de la charge provirale qui peut même devenir indétectable dans certains cas (Hishizawa et al., 2010; Ishida et al., 2013; Okamura et al., 2005).

Toutefois, cette procédure reste limitée à certains patients, principalement des sujets jeunes avec des formes agressives d'ATLL, en fonction de leur état et de l'existence d'un donneur compatible, car cela reste une intervention lourde et risquée (Marçais et al., 2012).

La combinaison IFN α /Zidovudine (AZT), développée il y a quelques années, semble être un traitement approprié, donnant d'excellents résultats, chez les patients atteints de formes aiguës, chroniques ou indolentes, avec des rémissions prolongées et complètes (Bazarbachi et al., 2010). Pour les formes lymphomateuses, ce traitement semble moins efficace, mais une étude a montré qu'associée à de la chimiothérapie classique, la combinaison IFN α /Zidovudine donne de bons résultats (Hodson et al., 2011).

Le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas encore très bien compris mais il semble s'appuyer sur l'effet antiviral de l'IFN α , ainsi que sur l'inhibition de la transcription inverse par l'AZT (Nasr et al., 2011). Ce mécanisme suppose une réplication du virus HTLV-1, via la transcriptase inverse, dans les cellules infectées, ce qui n'est pas le cas dans les cellules leucémiques. L'hypothèse est donc que le duo IFN α /Zidovudine agirait au niveau des réservoirs viraux, dans lesquels la multiplication virale aurait toujours lieu.

Des essais cliniques associant l'IFN α et l'AZT avec du trioxyde d'arsenic sont actuellement en cours. En effet, des études ont prouvé que l'IFN α agit en synergie avec l'arsenic pour favoriser la dégradation de la protéine Tax, ce qui stoppe l'activation constitutive de la voie NF- κ B, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose des cellules leucémiques (Bazarbachi et al., 1999; El-Sabban et al., 2000). Une étude récente a montré que la dégradation de Tax induite par le duo IFN α /arsenic était due à l'ubiquitine ligase RNF4 (*RING Finger protein 4*) (Dassouki et al., 2015).

Ces essais montrent des résultats très efficaces chez des malades atteints de forme chronique d'ATLL, avec d'excellents taux de survie et des effets indésirables modérés (Kchour et al., 2009). Dernièrement, il a été décrit que cette association IFN α /AZT/arsenic restaure un environnement immunocompétent chez les patients traités, qui pourrait contribuer à l'élimination des cellules ATLL, tout en évitant le développement d'infections opportunistes (Kchour et al., 2013).

Un essai clinique combinant l'arsenic et l'IFN α a également lieu et donne des résultats intéressants, surtout pour les formes chroniques et lymphomateuses, mais semble plus toxique que l'association IFN α /AZT/arsenic (Hermine et al., 2004; Suarez et al., 2011).

De nombreuses autres recherches se sont développées ces dernières années sur différents axes de traitement des ATLL, permettant de cibler d'autres mécanismes de cette pathologie complexe.

Ainsi, des essais cliniques sont en train d'être effectués avec des inhibiteurs d'histone déacétylase, favorisant l'apoptose des cellules leucémiques (Hasegawa et al., 2011).

Un inhibiteur du protéasome, appelé Bortezomib, induisant l'apoptose des cellules leucémiques, est également en cours d'évaluation (Satou et al., 2004), tout comme des inhibiteurs de la kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), activée dans les cellules ATLL (Evangelisti et al., 2014).

Plusieurs essais cliniques avec des anticorps monoclonaux, ciblant principalement les marqueurs CD25, CCR4 (*CC chemokine Receptor 4*) ou encore CD30, exprimés à la surface des cellules leucémiques, donnent des résultats efficaces (Tsukasaki and Tobinai, 2014). De nombreux autres anticorps sont actuellement à l'étude (Ai and Advani, 2015).

Enfin, il faut noter que des essais vaccinaux sont en œuvre, chez la souris mais également chez l'homme, basés sur l'induction d'une réponse cytotoxique dirigée contre certains épitopes, particulièrement immunogènes, de la protéine Tax (Sagar et al., 2014).

II.3.2. Paraparésie spastique tropicale/ myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM)

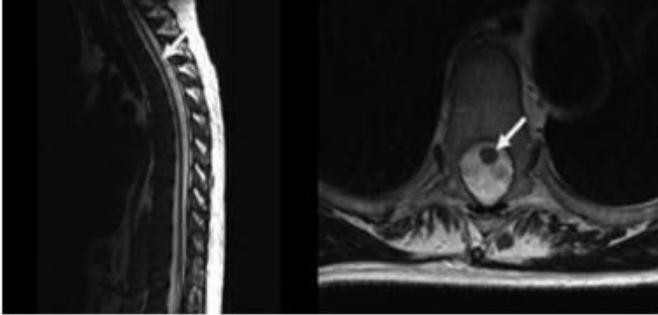
a) Tableau clinique

La paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM, *Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy*) est une maladie inflammatoire chronique, qui touche essentiellement les adultes, et en particulier les femmes, avec une apparition des premiers signes cliniques vers 40-50 ans (Gessain and Gout, 1992; Goncalves et al., 2010). Quelques cas chez des enfants ont été répertoriés mais ce sont des événements assez rares (Kendall et al., 2009).

Le lien entre l'infection par HTLV-1 et des cas de paraparésies spastiques tropicales (TSP) a été établi en 1985 par l'équipe de Guy de Thé, grâce à des études sérologiques et épidémiologiques réalisées chez des malades aux Antilles françaises (Gessain et al., 1985). Dans la même période, l'infection par HTLV-1 a également été associée à des myélopathies chroniques, dites HAM, chez des sujets au Japon (Osame et al., 1986). Une étude montra, peu de temps après, que ces deux pathologies étaient en fait une seule et unique maladie, qui fut qualifiée de TSP/HAM (Román and Osame, 1988).

L'incidence de la TSP/HAM est un peu plus faible que celle de l'ATLL puisque 0.25 à 3% des personnes infectées par HTLV-1 sont concernées, mais elle varie suivant les régions géographiques, témoignant de l'existence soit de facteurs génétiques favorables

A.



B.

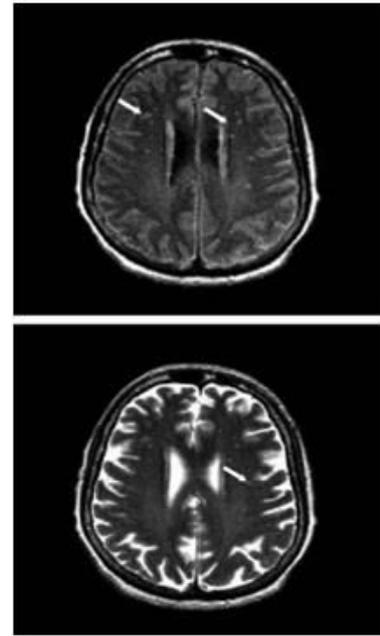


FIGURE 28 : Les infiltrations inflammatoires provoquent des atrophies de la moelle épinière et des lésions dans le cerveau, chez les malades atteints de TSP/HAM.

Imageries par résonance magnétique, chez des patients avec une TSP/HAM. Ces sujets présentent (A.) une atrophie de la moelle épinière (indiquée par la flèche blanche), (B.) ainsi que des lésions dans la substance blanche du cerveau (indiquées par la flèche blanche), causées par des infiltrations de cellules immunitaires, correspondant principalement des lymphocytes T. D'après (Goncalves et al., 2010).

au développement de la maladie chez les sujets contaminés, soit de cofacteurs socio-culturels ou environnementaux (Gessain and Mahieux, 2012; Orland et al., 2003).

La transmission sanguine du virus HTLV-1, notamment via des transfusions de sang, semble favoriser l'apparition de la TSP/HAM (Gessain and Mahieux, 2012). Par ailleurs, une contamination par transfusion associée à un jeune âge lors de l'apparition des signes cliniques sont autant d'événements augurant d'une progression très rapide de la maladie et d'un handicap plus sévère par la suite (Gotuzzo et al., 2004). Comme dans le cas de l'ATLL, la période entre la primo-infection et l'apparition des premiers signes cliniques peut être longue, correspondant à plusieurs dizaines d'années, mais parfois, le délai d'incubation de la maladie est court, variant de quelques mois à deux ans. C'est notamment le cas lors de contamination par transfusions sanguines (Gout et al., 1990; Kaplan et al., 1991).

Du point de vue pathologique, la TSP/HAM est une méningomyélite chronique qui est combinée à une démyélinisation et une dégénération axonale (Cooper et al., 2009). Elle se caractérise par des infiltrations de cellules immunitaires, surtout au niveau de la substance blanche de la moelle épinière, mais qui peuvent également avoir lieu au niveau de la substance grise (Gessain and Mahieux, 2012; Izumo, 2010). Ces infiltrations correspondent principalement à des lymphocytes T CD4⁺ au début de la maladie puis, par la suite, majoritairement à des lymphocytes T CD8⁺, provoquant une atrophie de la moelle épinière ainsi que des lésions de sa substance blanche (Umehara et al., 1993) (**FIGURE 28A**). Toute la moelle épinière peut être touchée mais, dans la plupart des cas, seule sa partie basse est atteinte. Récemment, il a été décrit que d'autres organes peuvent être affectés par des infiltrations inflammatoires, dont le cerveau et sa substance blanche (Mendes et al., 2014) (**FIGURE 28B**).

Au niveau clinique, pour la majorité des patients, le début de la maladie est insidieux, correspondant à des lombalgies, qui peuvent également affecter les membres inférieurs, avec des sensations de raideur et de faiblesse. Par ailleurs, à ce stade, de nombreux malades développent des troubles urinaires et sexuels (De Castro-Costa et al., 2006).

Par la suite, avec la progression de la maladie, apparaît une paraparésie ou une paraplégie spastique chez les sujets, entraînant d'importantes difficultés de déplacement (Nagai and Osame, 2003). En outre, la faiblesse musculaire au niveau de leurs membres inférieurs ainsi que les troubles sphinctériens sont accentués.

L'évolution de la TSP/HAM est variable toutefois, après 10 ans, près de 50% des patients sont grabataires (Araújo et al., 1995; Olindo et al., 2006).

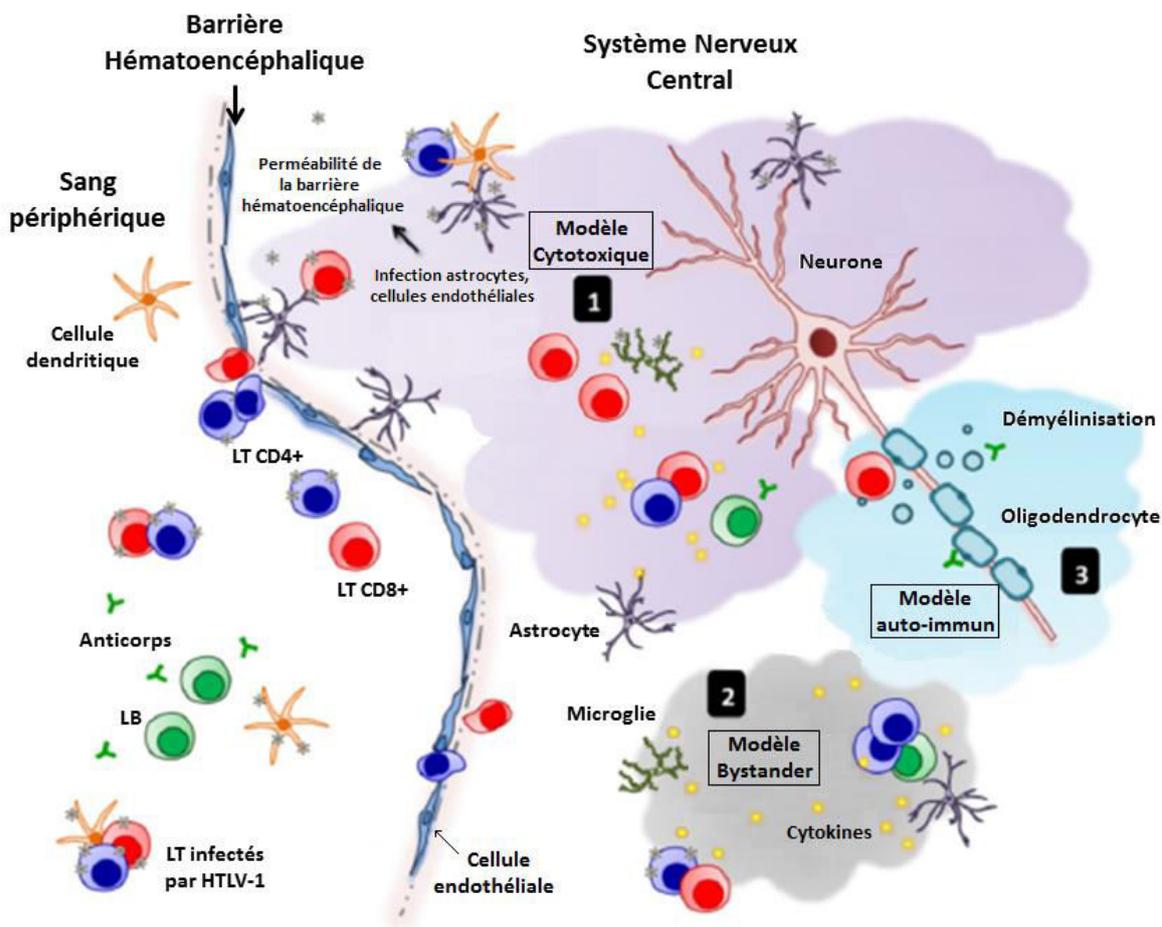


FIGURE 29 : Modèle de l'origine des lésions inflammatoires au niveau du système nerveux central des patients atteints de TSP/HAM.

Représentation schématique des trois hypothèses proposées pour expliquer les lésions observées au niveau du système nerveux central des patients atteints de TSP/HAM, suite à des infiltrations massives de cellules immunitaires et notamment de lymphocytes T (LT). (1) Un modèle cytotoxique dans lequel les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques, dirigés contre des antigènes viraux, détruisent massivement les cellules du système nerveux central infectées par le virus. (2) Un modèle « bystander », dans lequel ce sont les cytokines proinflammatoires, produites par les lymphocytes T présents dans le système nerveux central, qui sont responsables de l'altération des cellules nerveuses. (3) Un modèle auto-immun dans lequel les protéines des cellules nerveuses sont directement ciblées par le système immunitaire, en raison d'un mimétisme moléculaire. D'après (Olière et al., 2011).

Le diagnostic de cette maladie inflammatoire est établi essentiellement avec la démonstration de l'infection par HTLV-1, détectée au niveau biologique, par un titre sérique des anticorps dirigés contre le virus et une charge provirale élevés chez le malade (De Castro-Costa et al., 2006; Olindo et al., 2005). La présence d'une pléiocytose modérée, à prédominance lymphocytaire au niveau du liquide céphalorachidien, avec parfois des cellules leucémiques, qui peuvent aussi être retrouvées dans le sang, participent également à l'identification de la pathologie TSP/HAM. Enfin, des tests neurophysiologiques et l'imagerie par résonance magnétique sont utilisés pour préciser le diagnostic et suivre la progression de la maladie (Andrade, 2005; Felipe et al., 2008; Kira et al., 1991).

Contrairement à l'ATLL, quelques cas de neuromyélopathies semblables à la TSP/HAM ont été détectés chez des patients infectés par le virus HTLV-2, confirmant que ce virus a un pouvoir pathogène moins important que le HTLV-1 (Dooneief et al., 1996; Hjelle et al., 1992; Murphy et al., 1997).

b) Pathogenèse

Malgré de nombreuses études, les mécanismes à l'origine du développement de la maladie TSP/HAM chez les personnes infectées par HTLV-1 restent mal connus. Trois principales hypothèses sont avancées pour expliquer les lésions causées par les infiltrats inflammatoires massifs, qui sont observées au niveau du système nerveux central des patients (Matsuura et al., 2010; Saito, 2010) (**FIGURE 29**).

La première correspond à un modèle cytotoxique, dans lequel les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (LTc), dirigés spécifiquement contre des antigènes viraux (notamment Tax et HBZ), entrent massivement dans la moelle épinière et le cerveau pour détruire les cellules du système nerveux central infectées par le virus. Ce sont particulièrement les cellules gliales infectées par HTLV-1 qui sont lysées par les LTc (Lehky et al., 1995) (**FIGURE 29**).

Le deuxième modèle proposé est basé sur un mécanisme « bystander », dans lequel ce sont les cytokines proinflammatoires qui sont responsables de la destruction des cellules du système nerveux central. En effet, les lymphocytes T dirigés contre les antigènes viraux, dont les LTc, ainsi que ceux infectés par HTLV-1, qui sont présents dans les infiltrats, sécrètent de nombreuses cytokines, dont le TNF α et l'IFN γ , qui ont des effets délétères et pourraient être responsables de la destruction des cellules nerveuses (Kuroda and Matsui, 1993; Nakamura et al., 1993) (**FIGURE 29**).

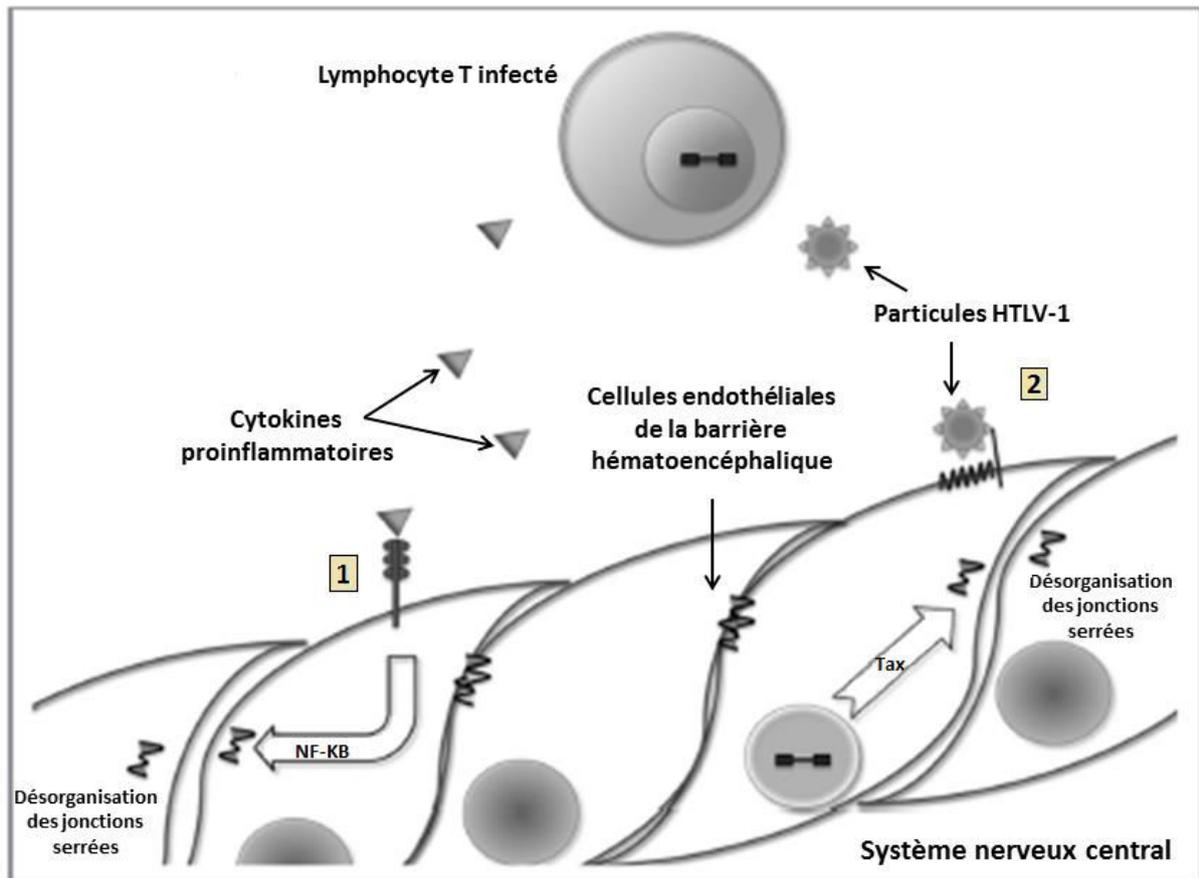


FIGURE 30 : Mécanismes viraux de déstabilisation de la barrière hématoencéphalique.

Représentation des mécanismes mis en place par le virus HTLV-1 pour franchir la barrière hématoencéphalique et entrer dans le système nerveux central. (1) Les lymphocytes infectés sécrètent des cytokines proinflammatoires, dont du $TNF\alpha$, qui activent la voie NF- κ B dans les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique, altérant les protéines composant les jonctions serrées entre ces cellules. La perméabilité de la barrière est alors augmentée, favorisant le passage des particules HTLV-1 et des lymphocytes T infectés. (2) Les cellules endothéliales peuvent également être infectées par le virus HTLV-1, provoquant une désorganisation des jonctions serrées, certainement via la protéine Tax, augmentant ainsi la perméabilité de la barrière hématoencéphalique. D'après (Miller et al., 2012).

Enfin, un modèle reposant sur des mécanismes auto-immuns est également proposé pour expliquer les lésions dans la moelle épinière et le cerveau des sujets TSP/HAM. Dans ce modèle, les protéines des cellules nerveuses sont directement ciblées par le système immunitaire, en étant reconnues par des anticorps et des clones de lymphocytes T autoréactifs, dirigés au départ contre la protéine Tax du virus HTLV-1. Ce mécanisme s'explique par un mimétisme moléculaire entre l'épitope dominant de Tax (situé entre ses résidus 346 à 353) et les protéines neuronales hnRNPA1 (*heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1*) (Levin et al., 2002) (**FIGURE 29**).

Quel que soit le modèle, le virus HTLV-1 ainsi que les cellules infectées doivent traverser la barrière hématoencéphalique, composée principalement de cellules endothéliales, pour pénétrer dans le système nerveux central et entraîner ensuite l'infiltration d'autres cellules immunitaires. Ce passage a été confirmé par la détection de protéines Tax dans le liquide céphalorachidien, ainsi que celle de lymphocytes T infectés, avec le même site d'intégration proviral que des lymphocytes T situés dans le sang du patient (Cartier and Ramirez, 2005; Cavrois et al., 2000).

Une étude *in vitro* a ainsi montré que les cellules T infectées sécrètent du TNF α , qui altère la couche de cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique, favorisant le passage des virions HTLV-1 à travers ces cellules, par transcytose ou infection transitoire (Romero et al., 2000) (**FIGURE 30**).

D'autres données ont confirmé la sécrétion de TNF α et d'IL-1 α par les lymphocytes T infectés, qui activent la voie NF- κ B dans les cellules endothéliales, provoquant la désorganisation des jonctions serrées entre les cellules, augmentant par conséquent la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Afonso et al., 2007a) (**FIGURE 30**). Par ailleurs, l'infection productive des cellules endothéliales a été prouvée, entraînant l'altération de l'expression des protéines constituant leurs jonctions serrées (Afonso et al., 2008). La protéine Tax pourrait, en outre, être impliquée dans la désorganisation de ces jonctions.

Grâce à ces différentes stratégies, le virus HTLV-1 et les lymphocytes T infectés peuvent donc déstabiliser la barrière hématoencéphalique et augmenter sa perméabilité, pour finalement favoriser leur entrée dans le système nerveux central (Miller et al., 2012).

A partir des différentes recherches menées sur la TSP/HAM, un modèle de développement de cette maladie inflammatoire a pu être établi, comprenant, comme pour le modèle de l'ATLL, plusieurs grandes étapes successives (Gessain, 2011) (**FIGURE 31**).

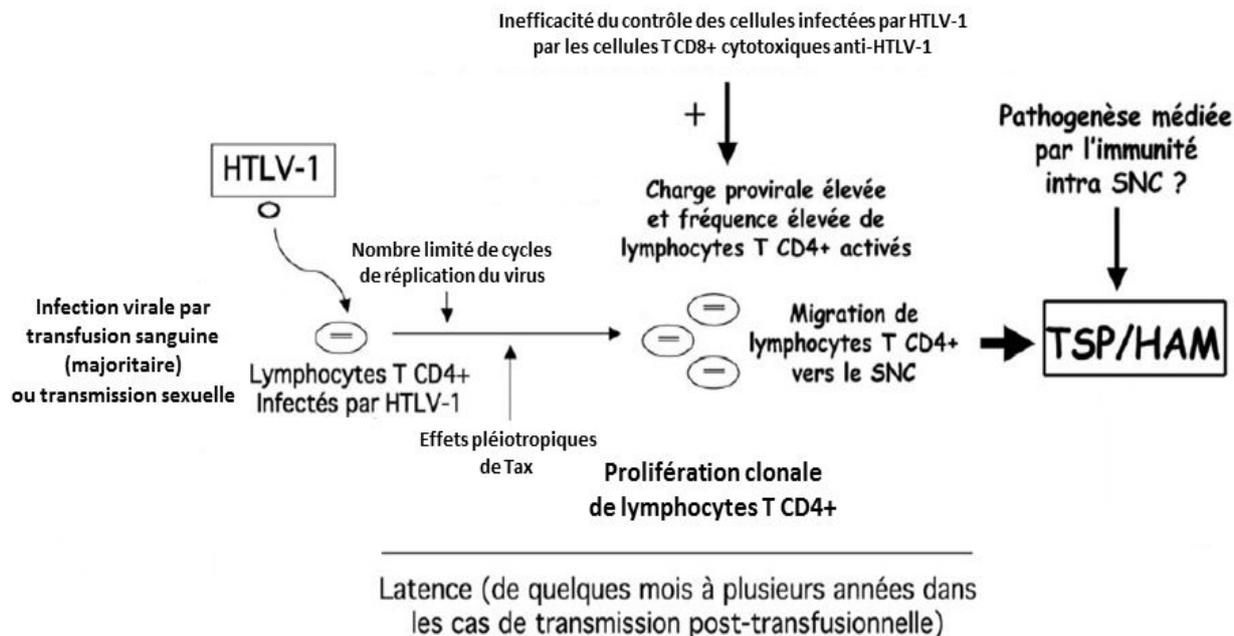


FIGURE 31 : Modèle de développement de la TSP/HAM associée à HTLV-1.

Ce modèle, basé sur l'ensemble des données disponibles actuellement, comporte trois étapes majeures : la primo-infection par transfusion sanguine essentiellement ou par transmission sexuelle, suivie de la prolifération clonale des lymphocytes infectés, dont les lymphocytes T CD4⁺, induite par la protéine Tax, et enfin la migration de ces cellules T CD4⁺ infectées vers le système nerveux central, dans lequel elles vont ensuite entrer, entraînant des lésions inflammatoires. La réponse immune anti-HTLV-1 induit l'arrivée d'autres cellules immunitaires, notamment des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques au niveau des infiltrats dans le système nerveux central, augmentant l'inflammation et les lésions. Au bout d'une période plus ou moins longue, suivant le mode de contamination des patients, la TSP/HAM se développe, provoquant d'importants handicaps chez les malades. D'après (Gessain, 2011).

Tout commence avec la primo-infection des individus par HTLV-1, qui se déroule, dans ce cas, essentiellement par transfusion sanguine, voir par transmission sexuelle.

Après une courte phase de multiplication et de production virale, HTLV-1 se réplique ensuite par expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ infectés principalement, induite par la protéine virale Tax (**FIGURE 31**).

Contrairement aux sujets asymptomatiques, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ne peuvent contrôler efficacement l'expansion de ces clones, conduisant donc à une augmentation de la charge provirale, ainsi qu'à une importante fréquence de cellules T CD4⁺ activés (**FIGURE 31**). Des études ont démontré que la présence d'une charge provirale élevée chez les personnes infectées par HTLV-1 constituait un facteur de risque important pour le développement d'une TSP/HAM et pour sa progression (Nagai et al., 1998; Olindo et al., 2005). Par ailleurs, le niveau d'expression de la protéine Tax dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés, qui induit leur expansion clonale et augmente donc la charge provirale, représente également un facteur de risque important dans l'apparition de la maladie (Bangham et al., 2009).

Enfin, les cellules T CD4⁺ infectés migrent vers le système nerveux central puis franchissent la barrière hématoencéphalique en la déstabilisant (**FIGURE 31**). Ces infiltrats sont renforcés par l'arrivée d'autres cellules immunitaires, dirigées contre les antigènes viraux, dans le cadre de la réponse immune anti-HTLV-1. Finalement, après une période de latence plus ou moins longue suivant le mode de contamination, le patient développe une TSP/HAM.

c) Traitements

Les lésions induites au cours de la TSP/HAM étant irréversibles, il est important de mettre au point des traitements permettant de limiter leur développement. Le traitement symptomatique est fondamental et constitue la base des thérapies élaborées, avec une prise en charge sur le long terme des patients.

Cependant, les molécules testées à l'heure actuelle restent décevantes car elles n'apportent que des améliorations modestes des symptômes et ce, uniquement, pour les sujets en phase précoce de la maladie (Gessain and Mahieux, 2012). En effet, la corticothérapie ainsi que l'emploi d'IFN α et d'IFN β 1a, modulant la réponse immune, montrent des effets limités (Izumo et al., 1996; Nakagawa et al., 1996; Oh et al., 2005). Une combinaison de deux analogues nucléosidiques (zidovudine et lamivudine), inhibant la transcription inverse virale, a également été testée mais n'a pas donné d'améliorations cliniques visibles (Taylor et al., 2006).

D'autres traitements (plasmaphérèse, immunoglobuline, anticorps anti-IL-2 humanisés, vitamine C à forte dose) ont, en outre, été essayés, mais sans réels effets cliniques chez les malades, bien que dans certains cas la charge provirale ait été diminuée (Gessain, 2011).

Des études cliniques ont également été réalisées sur le valproate (VPA), un inhibiteur d'histone déacétylase, permettant d'accroître l'expression du génome proviral dans les cellules infectées par HTLV-1.

Une première expérience, menée à la Martinique sur une cohorte de 16 patients souffrants d'un stade avancé de TSP/HAM, n'apporta aucune amélioration clinique, malgré une bonne efficacité du VPA, certainement en raison de la présence de lésions irrémédiables déjà causées au cours de l'évolution de la maladie (Lezin et al., 2007). Les résultats de cette étude ont permis d'imaginer une nouvelle stratégie, dans laquelle un traitement antirétroviral, comme la zidovudine (AZT), inhibant la transcriptase inverse, est administrée conjointement au VPA, pour éviter l'infection de nouvelles cellules, suite à l'induction de l'expression virale.

Une deuxième étude clinique, basée sur cette stratégie, a donc été menée récemment, en utilisant un modèle de primates non humains (*Papio papio*), naturellement infectés par le STLV-1, l'équivalent simien du HTLV-1, responsable d'ATLL chez le singe (Afonso et al., 2010). Dans le groupe d'animaux traités par l'association VPA/AZT, une diminution de la charge provirale, sans augmentation transitoire, a été constatée. Par ailleurs, cette combinaison induit une réponse cellulaire T CD8⁺ efficace contre le STLV-1, tout en empêchant l'infection de nouvelles cellules. Toutefois, dès l'arrêt du traitement, la charge provirale des animaux réaugmente, montrant les limites de cette thérapie, qui ne permet pas d'éradiquer le virus, certainement localisé dans des réservoirs non identifiés pour l'instant.

D'importantes recherches restent donc encore à effectuer, afin de mettre au point une stratégie thérapeutique adaptée pour limiter les effets importants et handicapants de la TSP/HAM.

II.3.3. Autres pathologies associées à HTLV-1

Plusieurs autres maladies ont été identifiées chez les patients contaminés par HTLV-1, en dehors de l'ATLL et de la TSP/HAM.

L'infection par le virus HTLV-1 a en effet été associée à des cas d'uvéites antérieures, particulièrement au Japon, au Brésil et dans la région des Caraïbes (Takahashi et al., 2000).

Des études épidémiologiques et virologiques ont ainsi prouvé la présence du HTLV-1 et de lymphocytes infectés au niveau du liquide vitreux de malades, établissant un lien certain entre cette pathologie et l'infection virale (Mochizuki et al., 1992; Ono et al., 1998).

Il a par ailleurs été décrit que l'uvéite pouvait se déclencher lors de la primo-infection par HTLV-1 ou être associée aux autres symptômes d'une TSP/HAM, particulièrement chez les sujets avec un handicap déjà avancé (Goncalves et al., 2010; Nakao et al., 1999).

Du point de vue clinique, cette maladie se manifeste par des troubles de la vision, plus ou moins sévères, qui disparaissent généralement après quelques semaines, mais resurgissent de façon récurrente. Les caractéristiques cliniques de l'uvéite peuvent cependant varier suivant les régions géographiques (Merle et al., 2002; Mochizuki et al., 1992; Pinheiro et al., 2006).

Le traitement de cette pathologie inflammatoire passe par l'emploi de corticostéroïdes qui réduisent efficacement les troubles de la vision.

Des dermatites infectieuses (HAID, *HTLV-1-Associated Infective Dermatitis*) ont également été diagnostiquées chez de jeunes enfants situés dans des régions endémiques pour HTLV-1 (Japon, Afrique), en particulier des régions tropicales (Jamaïque, Brésil) (Bittencourt and de Oliveira, 2010; Lee and Schwartz, 2011).

Cette maladie, plutôt rare, affecte essentiellement les enfants et se caractérise par de l'eczéma, ainsi que par des co-infections persistantes par *Staphylococcus aureus* et *Beta-haemolytic Streptococci* (McGill et al., 2012). Les cas de dermatites infectieuses ont, en outre, été corrélés à une transmission verticale du virus HTLV-1, au cours d'allaitements prolongés. Les complications dans cette maladie sont fréquentes et peuvent conduire au développement d'un ATLL ou d'une TSP/HAM (La Grenade, 1996; Oliveira et al., 2005).

Actuellement, ces pathologies sont traitées par des antibiothérapies prolongées, permettant de réduire voire de faire disparaître les lésions cutanées (Goncalves et al., 2010).

Le virus HTLV-1 a par ailleurs été associé à de rares cas d'atteinte musculaire, de type polymyosite ou myosite à inclusion (Desdouts et al., 2011).

D'autre part, certaines études ont suggéré que la co-infection HTLV-1 ou HTLV-2, chez des sujets déjà contaminés par HIV-1, favoriserait leur évolution vers le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Toutefois, ces données restent controversées et doivent être complétées par la réalisation d'études plus approfondies (Beilke, 2012; Brites et al., 2009).

III. TAX DU VIRUS HTLV-1: UNE PROTÉINE MODIFIÉE AUX EFFETS PLÉIOTROPES CENTRAUX DANS LE PROCESSUS ONCOGÈNE

La protéine régulatrice Tax (*Transcriptional Activator of pX region*) du virus HTLV-1 a un rôle essentiel dans la régulation de l'expression virale, mais également dans le processus oncogène, qui a lieu dans les cellules infectées et peut conduire au développement de l'ATLL. Les propriétés oncogéniques de Tax ont été constatées *in vitro*, par la transformation de fibroblastes de rongeurs et par l'immortalisation de lymphocytes T primaires humains, exprimant uniquement cette protéine virale (Bellon et al., 2010; Grassmann et al., 1992; Robek and Ratner, 1999; Tanaka et al., 1990). *In vivo*, des études ont confirmé ces résultats en montrant que des souris transgéniques exprimant Tax développaient différentes tumeurs, dont des leucémies et des lymphomes T semblables aux formes aiguës d'ATLL, suivant les promoteurs employés en amont du gène Tax (Grossman et al., 1995; Hasegawa et al., 2006; Nerenberg et al., 1987).

Le pouvoir oncogène de Tax s'explique par sa capacité à interagir avec de multiples protéines cellulaires et à moduler leurs activités, ainsi que les voies de signalisation dans lesquelles elles peuvent intervenir (Boxus et al., 2008). En perturbant ces protéines et ces voies cellulaires, Tax dérégule différents processus essentiels comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation des dommages à l'ADN. Ces dérégulations peuvent conduire à l'immortalisation puis à la transformation des cellules infectées par HTLV-1 (Chlichlia and Khazaie, 2010; Yang et al., 2011). L'activation constitutive de la voie NF- κ B induite par Tax, favorisant la prolifération et la survie des cellules T infectées, est notamment un élément central dans le processus oncogène et est particulièrement étudiée au sein de notre laboratoire (Qu and Xiao, 2011).

Dans les cellules, Tax est par ailleurs la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles, influençant sa localisation, son activité transactivatrice ainsi que son interaction avec les protéines cellulaires, dont celles de la voie NF- κ B (Lavorgna and Harhaj, 2014). L'étude de ces modifications, qui participent à la fonction de Tax, permet donc une meilleure compréhension du processus oncogène conduisant à l'ATLL.

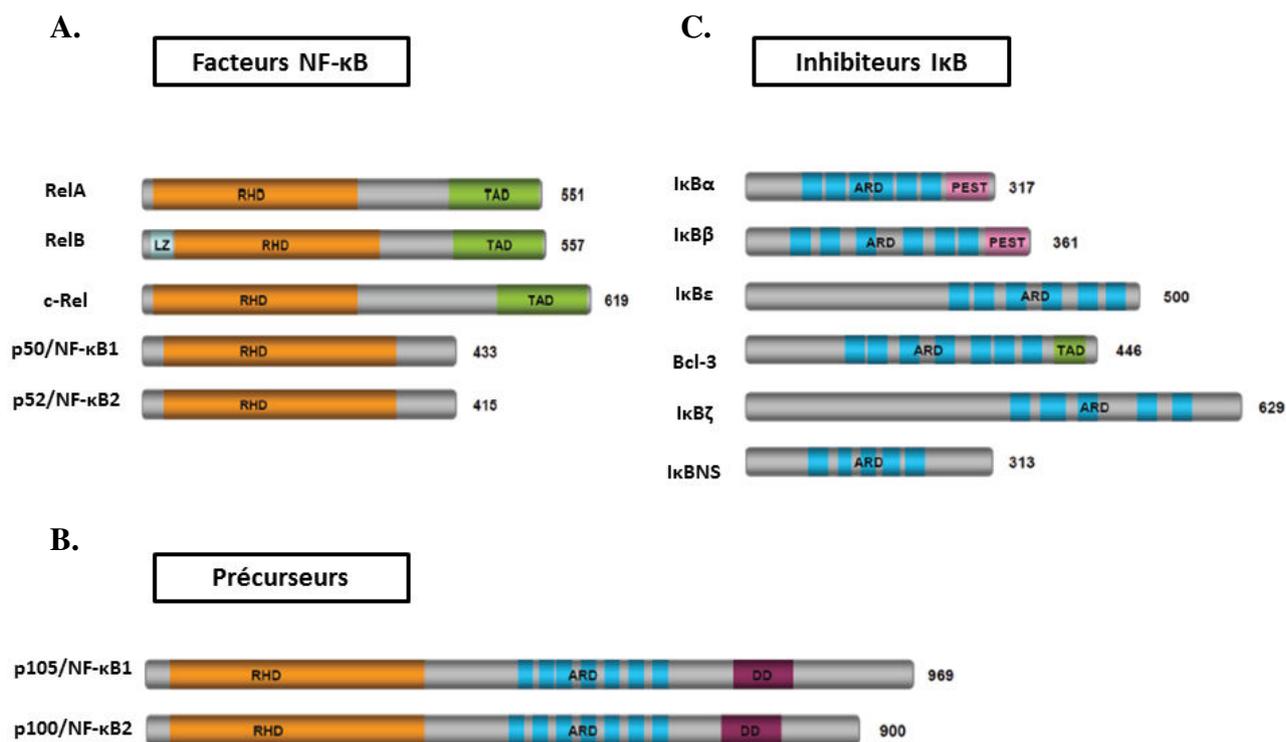


FIGURE 32 : Structure des facteurs NF- κ B et de leurs inhibiteurs I κ B.

Représentations schématiques (A.) des cinq facteurs NF- κ B, (B.) des deux précurseurs p105 et p100 et (C.) des six inhibiteurs I κ B répertoriés. Les domaines d'homologie à Rel (RHD) sont indiqués en orange dans la partie N-terminale de tous les facteurs NF- κ B et des précurseurs, leur permettant de se dimériser, de se lier à l'ADN ou encore d'être transloqués dans le noyau. Le domaine d'activation de la transcription (TAD) est illustré en vert et est présent uniquement dans la partie C-terminale des facteurs RelA, RelB et c-Rel. Les précurseurs p105 et p100, correspondant aux formes matures p50 et p52, possèdent des motifs ankyrine répétés (ARD), représentés en bleu, comme les inhibiteurs I κ B. Ces motifs peuvent interagir avec le domaine RHD des facteurs NF- κ B, entraînant leur séquestration dans le cytoplasme. D'après (Xiao and Fu, 2011).

III.1. La diversité de l'interactome Tax participe à son pouvoir oncogène dans les cellules

III.1.1. Tax active de nombreuses voies de signalisation cellulaires

La protéine Tax a été décrite comme pouvant interagir avec des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation, dont les voies NF- κ B, PI3K-Akt et MAPK, qui sont essentielles pour le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Shirinian et al., 2013).

a) Tax et la voie NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B repose sur l'activation de facteurs de transcription de la famille NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*), qui régulent l'expression de différents gènes cellulaires, avec des promoteurs à éléments de réponse κ B, impliqués dans la réponse immune et inflammatoire, l'apoptose, la différenciation ou encore la prolifération et la survie cellulaire (Gerondakis et al., 2013; Hayden and Ghosh, 2012; Kasper et al., 2010).

Il existe cinq facteurs de transcription NF- κ B : NF- κ B1 ou p50, NF- κ B2 ou p52, RelA ou p65, RelB et c-Rel (**FIGURE 32**). Ces protéines fonctionnent en homo ou hétérodimères pour réguler la transcription de leurs gènes cibles. En effet, elles possèdent toutes un domaine d'homologie à Rel, appelé RHD (*Rel Homology Domain*), dans leur partie N-terminale, qui leur permet de se dimériser, mais également d'être transloquées dans le noyau, grâce à la présence d'un signal d'import nucléaire (NLS), et de se lier spécifiquement à l'ADN ainsi qu'aux inhibiteurs I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*) (**FIGURE 32**).

Cependant, ces facteurs se différencient au niveau de leur partie C-terminale, ainsi que par leur mode de synthèse. Les facteurs RelA, RelB et c-Rel ont un domaine d'activation de la transcription (TAD, *Transactivating Domain*) et sont directement synthétisés sous leurs formes matures, tandis que p50 et p52 n'ont pas de domaine TAD au niveau C-terminal, les obligeant à s'hétérodimériser avec c-Rel et RelA ou avec RelB respectivement, et sont, en outre, générés sous forme de précurseurs protéiques, p105 et p100. De façon intéressante, ces précurseurs contiennent plusieurs motifs ankyrine répétés en C-terminal, qui sont également retrouvés chez les inhibiteurs I κ B (Mercurio et al., 1993; Rice et al., 1992) (**FIGURE 32**). Ces précurseurs sont clivés, constitutivement pour p105 et suite à une stimulation cellulaire pour p100, donnant alors naissance aux formes matures.

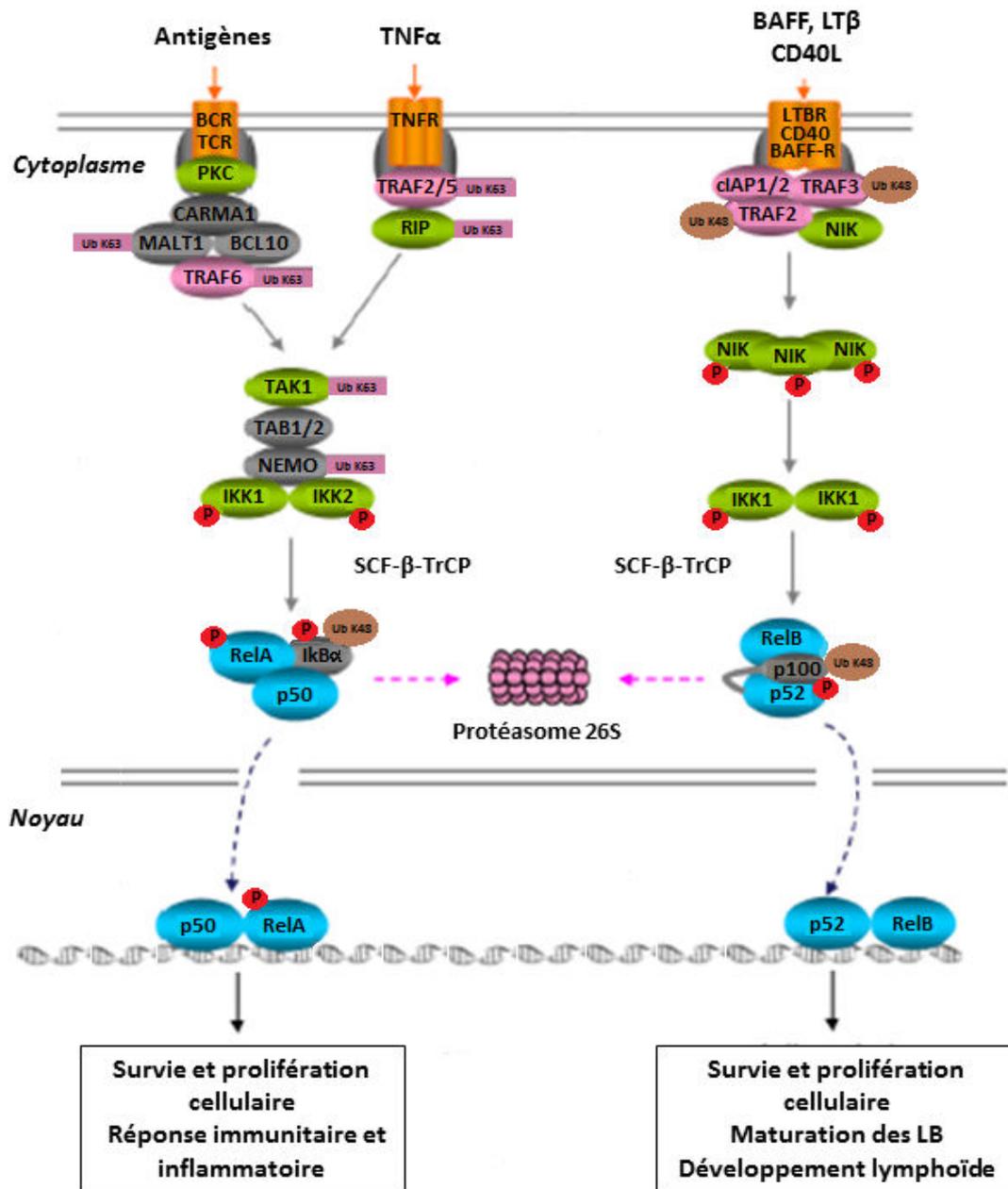


FIGURE 33 : Les voies NF-κB canonique et non canonique.

Représentation schématique des voies NF-κB canonique et non canonique, identifiées dans les cellules. Ces voies distinctes sont activées par différents stimuli et font intervenir des protéines spécifiques, comme le complexe IKK, composé d'une sous-unité régulatrice NEMO et de deux sous-unités catalytiques IKKα (ou IKK1) et IKKβ (ou IKK2), dans la voie canonique, ou l'homodimère IKKα dans la voie non canonique. L'activation de ces protéines conduit à la dégradation de l'inhibiteur IκBα dans un cas, libérant les facteurs p50/RelA, et au clivage protéolytique de p100 donnant sa forme mature p52 dans l'autre cas. Quel que soit la voie, les hétérodimères NF-κB migrent finalement dans le noyau pour se lier à leurs promoteurs à éléments de réponse κB spécifiques, régulant la transcription de divers gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire, mais également dans la réponse immunitaire et inflammatoire pour la voie canonique, et dans la maturation des lymphocytes B (LB) et le développement lymphoïde pour la voie non canonique. D'après (Qu and Xiao, 2011).

Actuellement, 6 inhibiteurs I κ B ont été dénombrés, en excluant p105 et p100, caractérisés par la présence de 5 à 7 motifs ankyrine répétés, qui leur permettent de se lier au domaine RHD des facteurs NF- κ B, masquant ainsi leur signal d'import nucléaire et les séquestrant dans le cytoplasme (Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**FIGURE 32**). Cette liaison des inhibiteurs aux facteurs NF- κ B est observée dans les cellules non stimulées. En revanche, lorsque la voie NF- κ B est activée, par le biais de différents stimuli externes, les inhibiteurs sont dégradés entraînant la libération des facteurs, qui migrent dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles.

Dans les cellules, deux voies de signalisation NF- κ B ont été identifiées : la voie canonique (ou classique) et la voie non-canonique (ou alterne) (Qu and Xiao, 2011; Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**FIGURE 33**).

La voie canonique est activée par des pathogènes ou des cytokines proinflammatoires (TNF α , IL-1 β) et implique la dégradation de l'inhibiteur I κ B (principalement I κ B α), ainsi que la translocation nucléaire d'hétérodimères composés du facteur RelA (Silverman and Maniatis, 2001).

En réponse aux signaux d'activation, les protéines adaptatrices TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*) sont recrutées au niveau des récepteurs sous la membrane plasmique, avec d'autres protéines cellulaires, et sont activées par auto-polyubiquitinylation avec des chaînes d'ubiquitine liées en K63 (**FIGURE 33**). Les protéines TRAF recrutent ensuite la kinase TAK1 (*Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1*), associée à deux sous-unités régulatrices TAB1 et TAB2, et induisent son activation par ubiquitinylation K63 (Adhikari et al., 2007; Skaug et al., 2009). Les TRAF recrutent également le complexe IKK (*I κ B Kinase*), qui est composé d'une sous-unité régulatrice IKK γ ou NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*) et de deux sous-unités catalytiques, IKK α (ou IKK1) et IKK β (ou IKK2) (Israël, 2010).

TAK1 peut alors phosphoryler et activer IKK α et β , qui à leur tour, phosphorylent l'inhibiteur I κ B α , au niveau de ses sérines 32 et 36 (Brockman et al., 1995) (**FIGURE 33**).

Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation d'I κ B α avec des chaînes de type K48 par l'ubiquitine ligase SCF- β -TrCP (*Skp1-Cullin-F-box- β -Transducin repeat-Containing Protein*), conduisant finalement à sa dégradation par le protéasome 26S cellulaire (Chen et al., 1995).

Les hétérodimères NF- κ B, essentiellement p50/RelA, sont libérés et peuvent migrer dans le noyau où ils se lient aux éléments de réponse κ B, dans les promoteurs de leurs gènes cibles. La phosphorylation de RelA a par ailleurs été démontrée comme favorisant le recrutement des co-activateurs CBP/p300 au niveau des promoteurs (Zhong et al., 2002).

La voie non canonique est activée par un nombre plus limité de stimuli, dont BAFF (*B-cell Activating Factor*), la lymphotoxine β (LT β), le ligand de CD40, TWEAK (*TNF-like Weak inducer of apoptosis*) ou RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*) et elle serait plutôt impliquée dans la maturation des lymphocytes B et dans le développement lymphoïde (Xiao et al., 2006).

L'activation de cette voie est plus lente que celle de la voie canonique et dépend de la synthèse de la protéine kinase NIK (*NF- κ B-Inducing Kinase*) (Xiao et al., 2001). Bien que ses ARNm soient relativement abondants, le niveau des protéines NIK dans les cellules non stimulées reste faible, en raison de leur dégradation constitutive, dépendante de la protéine TRAF3. En effet, la kinase NIK est recrutée par le complexe TRAF2/TRAF3 sous la membrane plasmique, entraînant alors le recrutement de nouvelles protéines, c-IAP1/2 (*cellular-Inhibitors of Apoptosis 1 and 2*), qui ubiquitinylent NIK avec des chaînes K48, induisant sa protéolyse (Liao et al., 2004; Sun and Ley, 2008).

En réponse aux stimuli, les protéines TRAF3 et TRAF2 sont les cibles de l'ubiquitinylation et de la dégradation par le protéasome cellulaire, ce qui favorise l'accumulation de protéines NIK dans le cytoplasme (**FIGURE 33**). Ces kinases s'oligomérisent et sont ensuite activées, probablement par auto-phosphorylation, leur permettant de phosphoryler et d'activer à leur tour les sous-unités IKK α , les protéines IKK β et NEMO n'étant pas impliquées dans l'activation physiologique de la voie non canonique. Les dimères d'IKK α sont alors recrutés au niveau des protéines RelB/p100 pour induire la phosphorylation de p100. Comme dans le cas de la voie canonique, p100 est ensuite ubiquitinylée par SCF- β -TrCP, provoquant sa dégradation partielle via le protéasome, pour finalement former le facteur mature p52 (Xiao et al., 2001) (**FIGURE 33**). Le dimère RelB/p52 migre enfin dans le noyau, où il se lie à ses promoteurs cibles.

La dérégulation des voies NF- κ B a été reliée à différentes maladies chez l'homme, dont les cancers (Xiao and Fu, 2011). Elle a également été observée dans des cellules leucémiques de patients ATLL, ainsi que dans des cellules transformées par le virus HTLV-1 *in vitro* (Kfoury et al., 2012).

Par ailleurs, des études ont montré que la protéine Tax était responsable de l'activation constitutive des voies NF- κ B et que ce mécanisme était crucial pour induire l'immortalisation de lymphocytes T primaires humains ou encore la transformation de fibroblastes de rat (Leung and Nabel, 1988; Robek and Ratner, 1999; Ruben et al., 1988; Yamaoka et al., 1996). Pour provoquer cette activation, Tax intervient à différentes étapes des voies NF- κ B canonique et non canonique (Shirinian et al., 2013) (**FIGURE 34A**).

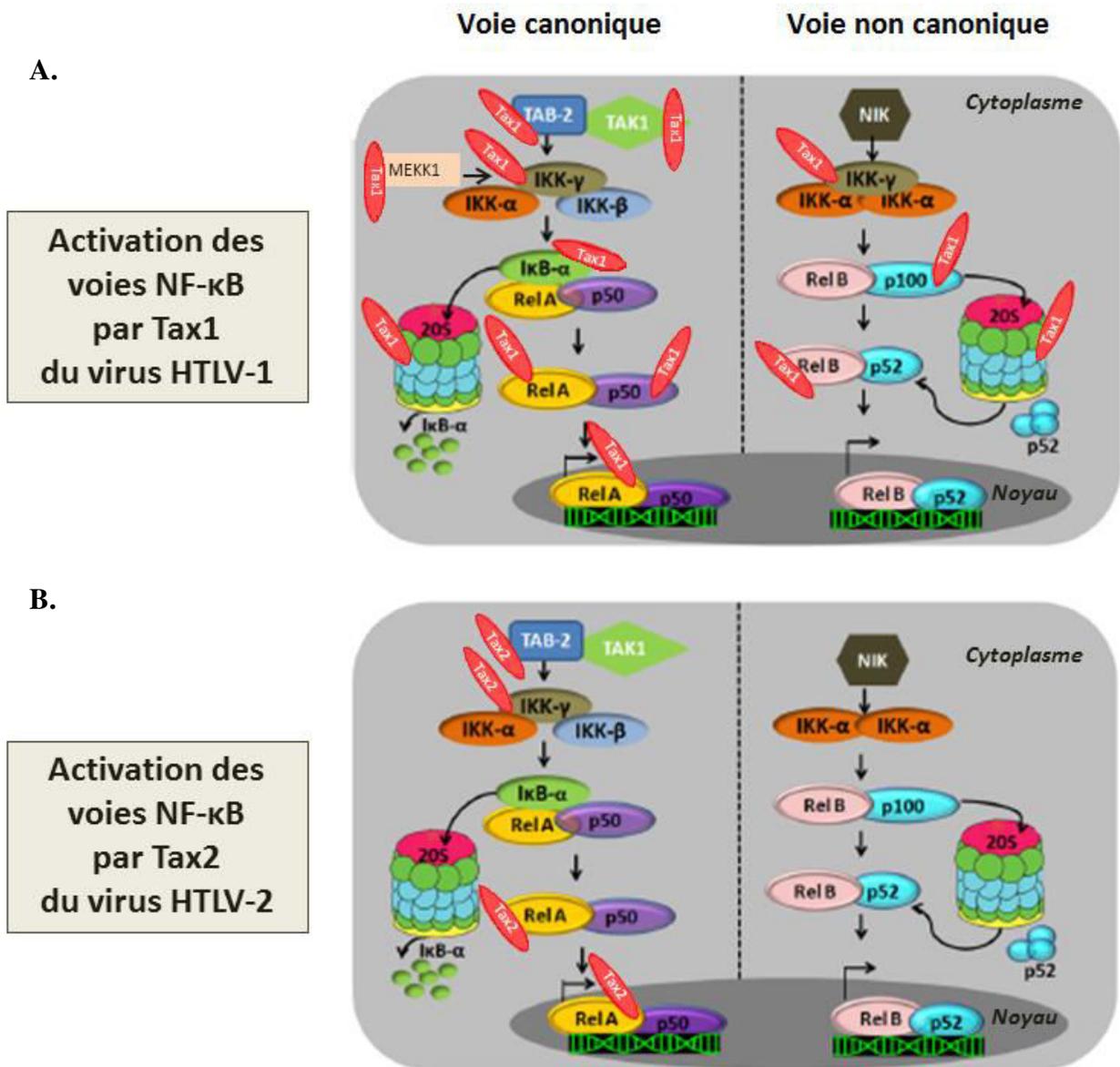


FIGURE 34 : Activation des voies NF- κ B par les protéines Tax1 et Tax2.

Représentation schématique de l'activation des voies NF- κ B canonique et non canonique par les protéines (A.) Tax1 du virus HTLV-1 et (B.) Tax2 du virus HTLV-2. Tax1 et Tax2 (illustrées en rouge) peuvent activer la voie canonique en interagissant avec différents composants, dont la protéine NEMO (IKK γ) du complexe IKK, qui est l'élément central de la voie canonique. En revanche, seule Tax1 est capable d'activer la voie non canonique, la protéine Tax2 ne pouvant se lier à p100 et induire son clivage protéolytique en p52. D'après (Shirinian et al., 2013).

Au niveau de la voie canonique, Tax s'associe directement au complexe IKK, en interagissant avec NEMO, induisant son activation (Harhaj and Sun, 1999; Jin et al., 1999; Kfoury et al., 2005). Des études ont montré que NEMO possède deux domaines leucine zipper, en positions N et C-terminales, capables de se lier à une région riche en leucine de Tax (Sun et al., 2000). Une hypothèse avancée pour expliquer l'activation constitutive du complexe IKK induite par Tax était que celle-ci favorisait la phosphorylation et l'activation croisée des sous-unités catalytiques IKK α et β (Sun and Yamaoka, 2005). Toutefois, une étude *in vitro* a prouvé que la seule interaction de Tax avec le complexe IKK n'était pas suffisante pour activer ce complexe et que d'autres facteurs cytosoliques étaient nécessaires (Shibata et al., 2011).

Tax pourrait donc recruter d'autres kinases pour phosphoryler les sous-unités d'IKK et l'activer. Plusieurs candidates ont été identifiées, comme la kinase NIK ou MEKK1 (*MAPK/ERK Kinase Kinase 1*) (Uhlik et al., 1998; Yin et al., 1998). Tax a par ailleurs été décrite comme interagissant avec la kinase TAK1 et avec la sous-unité TAB2, favorisant ainsi leur activation et leur recrutement au niveau du complexe IKK (Wu and Sun, 2007; Yu et al., 2008) (**FIGURE 34A**). Toutefois, le rôle de ces kinases reste sujet à controverse, puisque des études ont démontré que l'inhibition de l'expression de NIK, MEKK1 ou TAK1 n'impactait pas l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax (Gohda et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc le recrutement de plusieurs kinases par Tax pour phosphoryler le complexe IKK.

Dans la voie canonique, Tax peut aussi directement se fixer à l'inhibiteur I κ B, via ses motifs ankyrine répétés, et notamment à I κ B α , pour favoriser sa dégradation, indépendamment de sa phosphorylation par le complexe IKK (Hirai et al., 1994; Suzuki et al., 1995) (**FIGURE 34A**). Par ailleurs, Tax interagit avec les sous-unités HsN3 et HC9 du corps catalytique 20S du protéasome cellulaire, afin de renforcer sa liaison avec les I κ B, favorisant ainsi leur dégradation (Rousset et al., 1996). Cette interaction entre Tax et le protéasome augmente également la maturation protéolytique de p105.

Par conséquent, en induisant l'élimination des inhibiteurs I κ B, Tax libère les hétérodimères p50/RelA, qui migrent dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles. Au niveau de cette dernière étape, Tax peut d'ailleurs se lier à RelA, favorisant sa fixation au niveau des promoteurs cibles (**FIGURE 34A**).

En ce qui concerne la voie non canonique, Tax utilise des acteurs différents de ceux mis en jeu dans l'activation physiologique. En effet, Tax interagit avec NEMO, induisant le recrutement des sous-unités IKK α et entraînant la phosphorylation de p100 à l'origine de son clivage protéolytique en p52 (**FIGURE 34A**). Comme pour la voie canonique, Tax se lie au protéasome ou à p100 pour augmenter sa maturation (Lanoix et al., 1994; Qu et al., 2004).

Il faut d'autre part noter que Tax, en activant la voie non canonique, favorise la stimulation de la voie canonique. En effet, l'activation de la voie non canonique entraîne la répression du gène codant pour la protéine WWOX, connue pour inhiber le recrutement d'IKK α et la phosphorylation de RelA induits par Tax (Fu et al., 2011). Il existe donc un phénomène coopératif entre les deux voies, sur lequel la protéine Tax se base pour les activer massivement.

Par ailleurs, l'ensemble de ces données indique que NEMO est un partenaire essentiel de Tax, que ce soit dans la voie canonique ou non canonique, qui le détourne afin d'activer de façon constitutive les voies NF- κ B.

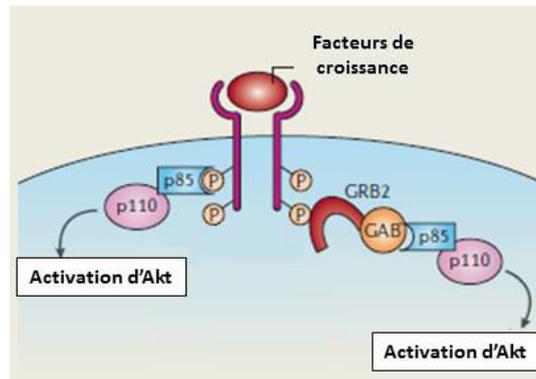
De nombreuses études ont mis en évidence la capacité de la protéine Tax du virus HTLV-2 (aussi appelée Tax2) à activer la voie NF- κ B canonique, de la même façon que la protéine Tax (ou Tax1) du HTLV-1, qui vient d'être présentée (Meertens et al., 2004; Turci et al., 2009). Tax2 peut en effet interagir avec NEMO ou avec TAB2, comme le fait Tax1 (**FIGURE 34B**). La principale différence entre ces deux protéines réside dans le fait que Tax2 ne puisse activer la voie NF- κ B non canonique. En effet, Tax2 ne peut se lier à p100 et induire son clivage protéolytique en p52 (Higuchi et al., 2007) (**FIGURE 34B**). Cette différence entre les deux protéines a été associée à la présence d'un motif situé entre les résidus 225 à 232 de Tax1, qui est absent dans Tax2 (Shoji et al., 2009).

L'incapacité de Tax2 à activer la voie non canonique contribue, en partie, à expliquer son impossibilité à transformer les lymphocytes T *in vivo*, car l'activation induite de la kinase NIK dans des cellules T *in vitro*, entraîne une activité transformante de Tax2, au même niveau que Tax1 (Higuchi et al., 2007).

Ces différences d'activation des voies NF- κ B entre Tax1 et Tax2 sont certainement un des éléments participant aux différences de pathogénèse constatées entre les virus HTLV-1 et HTLV-2.

L'activation constitutive des voies NF- κ B par Tax, dans les cellules infectées par HTLV-1, est donc l'une des étapes cruciales du processus oncogène. En interagissant avec plusieurs composants de cette voie, Tax peut ainsi perturber la transcription de gènes cellulaires clés impliqués dans la prolifération, l'apoptose ou encore la réponse immune, favorisant la survie, la multiplication et la transformation des cellules infectées (Currer et al., 2012; Grassmann et al., 2005). L'étude des mécanismes de dérégulation des voies NF- κ B mis en place par Tax a, en outre, permis des avancées majeures dans la compréhension de l'activation physiologique et pathologique de ces voies.

A.



B.

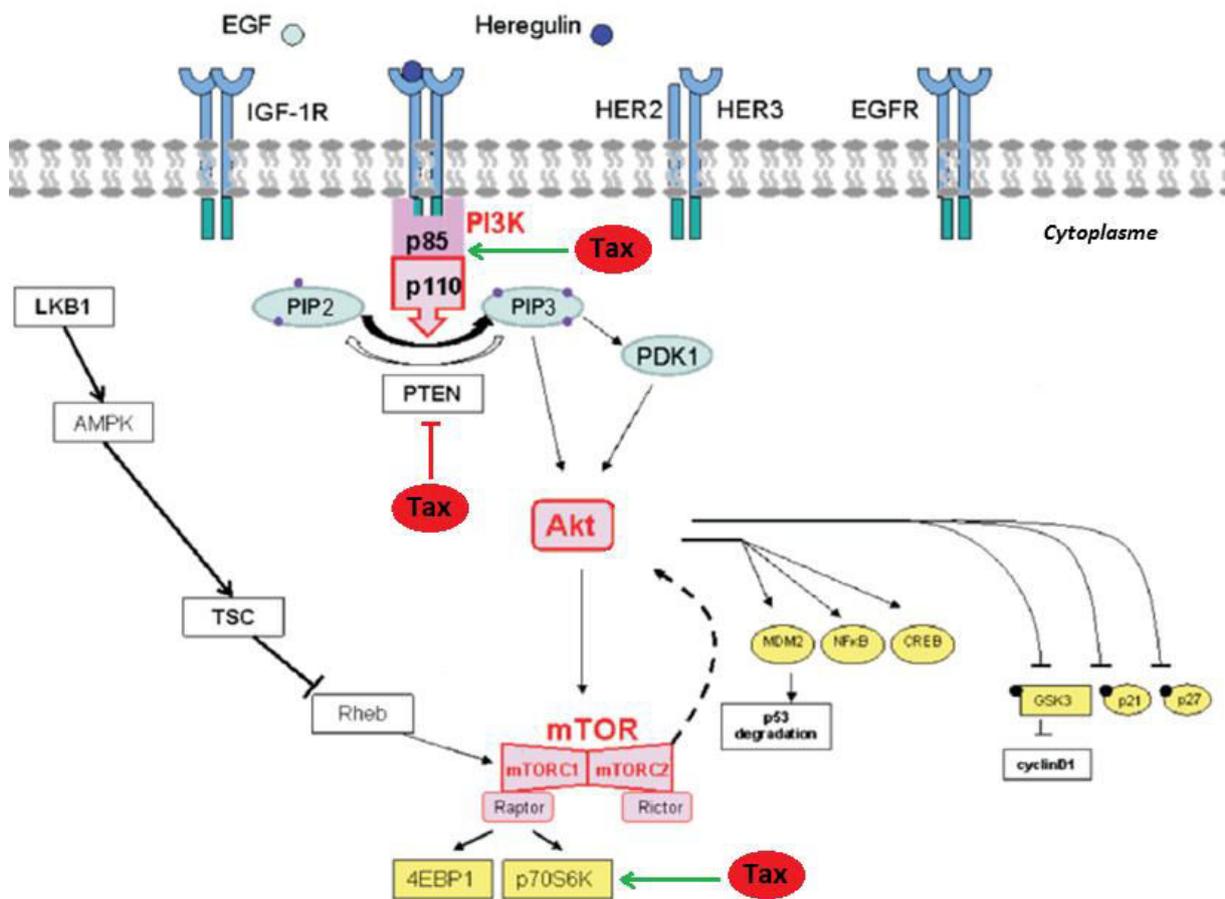


FIGURE 35 : La voie PI3K-Akt et son activation par la protéine Tax.

- A. Représentation schématique des premières étapes de l'activation de la voie PI3K-Akt, avec la fixation des stimuli, comme des facteurs de croissance, sur leurs récepteurs tyrosine-kinase spécifiques. La protéine PI3K, composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110, est recrutée et peut interagir avec ces récepteurs, soit directement, soit via les protéines GRB2 et GAB, ce qui induit son activation. D'après (Cully et al., 2006).
- B. Représentation schématique de l'ensemble de la voie de signalisation cellulaire PI3K-Akt, avec les différents composants qui peuvent être détournés par la protéine virale Tax, afin d'activer la voie (activation de la PI3K et des protéines effectrices en aval de mTOR ou encore inhibition de PTEN). D'après (Cheaib et al., 2015).

b) Tax et la voie PI3K-Akt

La voie de signalisation PI3K (*Phosphoinositide-3-Kinase*)-Akt joue un rôle essentiel dans la survie, la prolifération et la mobilité cellulaire, ainsi que dans l'apoptose et le métabolisme.

Cette voie est activée par la fixation d'hormones ou de facteurs de croissance, comme EGF (*Epidermal Growth Factor*), au niveau de récepteurs tyrosine-kinase (IGF-1R, EGFR, HER2), situés à la surface des cellules (Cheaib et al., 2015). Suite à ces stimuli, les récepteurs se dimérisent et s'auto-phosphorylent, entraînant le recrutement de la PI3K, qui peut interagir directement avec la partie cytosolique des récepteurs, ou via les protéines GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) et GAB (*GRB2-Associated Binding protein*) (Cully et al., 2006) (**FIGURE 35A**). La protéine PI3K est composée d'une sous-unité régulatrice p85, qui se lie notamment au récepteur, et d'une sous-unité catalytique p110, qui est activée par cette interaction. La sous-unité p110 induit la phosphorylation de PIP2 (*Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate*), entraînant la formation d'un nouveau messager actif, PIP3 (*Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate*), qui recrute sous la membrane plasmique les kinases PDK1 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*) et Akt, aussi appelée PKB (*Protéine Kinase B*) (**FIGURE 35B**).

Akt est un élément central de cette voie, dont l'activation par phosphorylation, induite par PDK1, entraîne la régulation de nombreuses protéines, dont p53, les facteurs NF- κ B ou encore CREB, favorisant la transcription de gènes anti-apoptotiques ou impliqués dans la prolifération cellulaire (**FIGURE 35B**). La kinase Akt active également le complexe mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*), composé des protéines mTORC1-Raptor et mTORC2-Rictor, qui inhibe l'apoptose et contrôle la survie et la croissance cellulaire (Huang and Fingar, 2014).

Cette voie PI3K-Akt possède par ailleurs des mécanismes de régulation négative, dont la protéine PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), qui réprime l'activation de la voie en déphosphorylant PIP3, ou la protéine LKB1 (*Liver kidney Kinase B1*) qui active le complexe GTPase TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), inhibant ainsi mTOR via la répression de la petite protéine G Rheb (**FIGURE 35B**).

La voie PI3K-Akt est fréquemment dérégulée dans les cancers chez l'homme (Nicholson and Anderson, 2002). Son activation a également été constatée dans des cellules de patients ATLL, ainsi que dans des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 (Ikezoe et al., 2007; Jeong et al., 2005a).

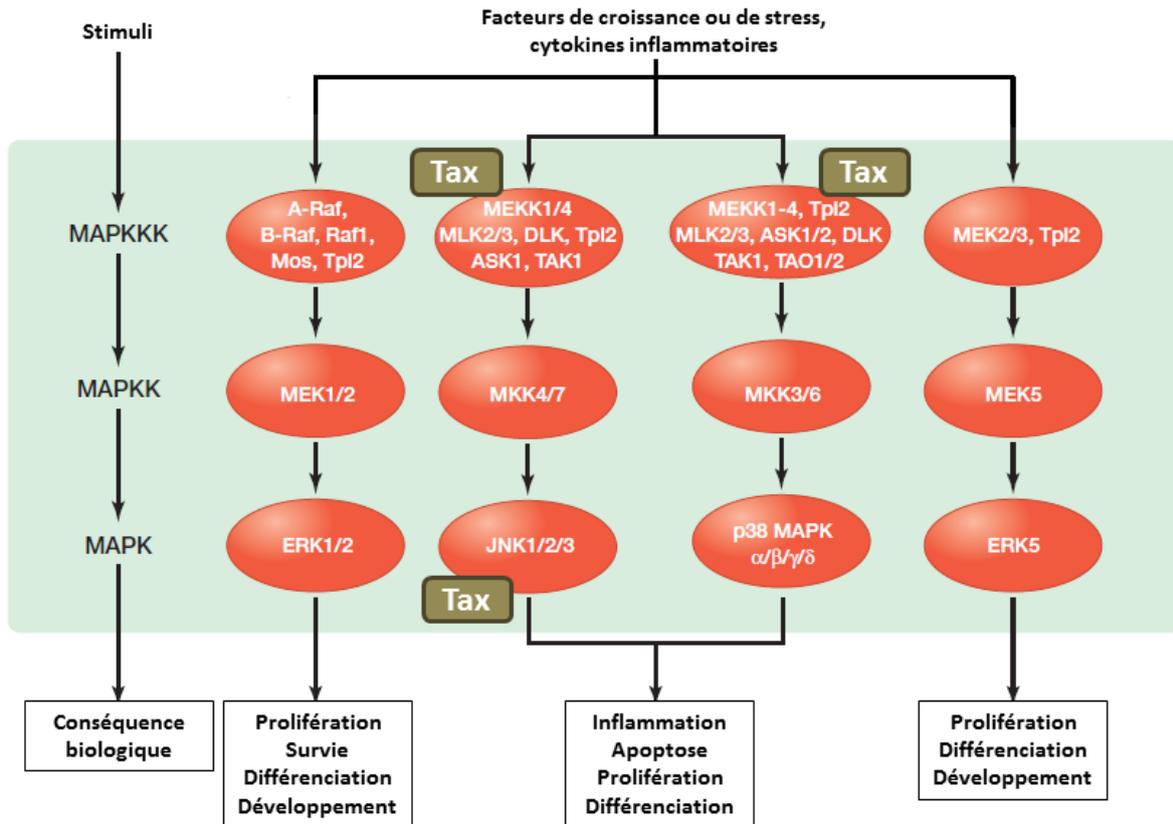


FIGURE 36 : La voie MAPK et son activation par la protéine Tax.

Représentation schématique de la voie MAPK et de ses quatre cascades principales, faisant intervenir de multiples composants : ERK5, p38, JNK et ERK. Chaque cascade est constituée de trois types de kinases, activées successivement : MAP3K (ou MAP3KK), MAP2K (ou MAPKK) et MAPK. Ces kinases sont activées par différents types de stimuli externes comme les facteurs de croissance ou de stress ou encore les cytokines inflammatoires. L'activation de ces cascades conduit à la phosphorylation de différents effecteurs cytosoliques ou nucléaires, impliqués dans de nombreux processus biologiques, comme la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire ou l'apoptose. La protéine virale Tax dérégule différents composants de ces voies MAPK, comme JNK1, MEKK1 ou TAK1, pour les activer constitutivement. D'après (Morrison, 2012).

De même, il a été montré que des fibroblastes embryonnaires de rat ainsi que des cellules T de souris, transformés par la protéine virale Tax, avaient une activation de leur voie PI3K-Akt, qui semblait requise pour leur transformation (Liu et al., 2001; Yoshita et al., 2012).

Comme pour NF- κ B, la protéine Tax est capable d'activer la voie de signalisation PI3K-Akt en intervenant sur différents composants (**FIGURE 35B**).

Tax peut en effet interagir avec la sous-unité p85 de la PI3K, favorisant ainsi la dissociation du complexe p85/p110, ce qui augmente l'activité de la sous-unité catalytique p110 (Peloponese and Jeang, 2006; Ueki et al., 2002).

Des études ont, en outre, prouvé que Tax pouvait agir au niveau des protéines cibles du complexe mTOR, pour induire leur activation, ainsi qu'au niveau des régulateurs négatifs de la voie, dont PTEN, en réprimant leur expression (Fukuda et al., 2012; Yoshita et al., 2012) (**FIGURE 35B**).

Outre son rôle essentiel dans différents processus biologiques, la voie PI3K-Akt est connectée à de nombreuses autres voies de signalisation, ce qui en fait une cible de choix pour le virus HTLV-1. Elle fait d'ailleurs l'objet d'étude dans le cadre du traitement de l'ATLL, puisque des essais pré-cliniques avec des inhibiteurs de PI3K-Akt sont en cours de réalisation (Roti and Stegmaier, 2014).

c) Tax et la voie MAPK

Les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont une famille de protéines serine/thréonine kinases cytosoliques, organisées en voie de signalisation correspondant à une cascade de phosphorylation. En effet, une première protéine kinase, MAP3K, est stimulée, induisant l'activation par phosphorylation d'une deuxième protéine kinase, MAP2K, qui elle-même active par phosphorylation une dernière protéine kinase, MAPK (**FIGURE 36**). Cette kinase MAPK activée phosphoryle ensuite différentes protéines cellulaires cytoplasmiques, ainsi que des facteurs de transcription dans le noyau, impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose des cellules (Keshet and Seger, 2010; Morrison, 2012).

La voie des MAPK est la voie de signalisation cellulaire la plus vaste, avec près de 200 composants, regroupés dans quatre cascades principales : ERK5, p38, JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (**FIGURE 36**).

Ces cascades de signalisation sont activées par des stimuli externes multiples, comme des facteurs de croissance, des cytokines ou des facteurs de stress, qui se fixent à des récepteurs tyrosine-kinase ou couplés aux protéines G, entraînant l'activation des kinases MAP3K, via des protéines adaptatrices ou de petites protéines G, comme Ras (Keshet and Seger, 2010).

Comme pour NF- κ B et PI3K-Akt, la voie des MAPK est dérégulée dans de nombreux cancers (Dhillon et al., 2007). L'activation de la cascade JNK a par ailleurs été constatée dans des cellules de patients ATLL, ainsi que dans des lymphocytes T transformés *in vitro* par HTLV-1 (Arnulf et al., 2002; Xu et al., 1996).

La protéine Tax est capable d'agir sur différents composants des voies MAPK, notamment en activant les kinases JNK1 ou MEKK1 (Jin et al., 1997; Yin et al., 1998) (**FIGURE 36**). Comme cela a été décrit précédemment, Tax peut également interagir avec la MAP3K TAK1 et avec sa sous-unité régulatrice TAB2 pour les activer (Wu and Sun, 2007; Yu et al., 2008) (**FIGURE 36**). Par ailleurs, une étude a montré une interaction entre Tax et des protéines de la famille des petites protéines G, suggérant une possible action de Tax sur la protéine Ras, conduisant à l'activation de la cascade ERK (Wu et al., 2004).

En dérégulant ces trois importantes voies de signalisation, la protéine Tax module des processus biologiques essentiels pour la vie de la cellule, permettant ainsi la persistance des cellules infectées par HTLV-1 et leur multiplication. En outre, les voies NF- κ B, PI3K-Akt et MAPK, comme l'ensemble des voies de signalisation, sont extrêmement interconnectées. En effet, comme cela a été décrit, les MAP3K, MEKK1 et TAK1, sont impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B. De même, l'activation de la kinase Akt stimule la voie NF- κ B (Jeong et al., 2005a) et la cascade ERK de la voie des MAPK peut également activer la protéine PI3K (Sever and Brugge, 2015). Ainsi, cette interconnection participe à amplifier l'impact de la protéine Tax dans les cellules.

Il semble donc que l'immortalisation et la transformation cellulaire induites par Tax ne soient pas les conséquences du dérèglement d'une voie cellulaire en particulier, mais de l'ensemble des voies, qui finalement coopèrent pour altérer de multiples processus biologiques. D'autre part, Tax détourne de nombreux autres acteurs cellulaires impliqués dans la transcription, afin de favoriser la réplication du génome proviral, mais aussi dans le cycle cellulaire et l'apoptose, permettant la prolifération et la survie des cellules infectées, ou encore dans la réparation des dommages à l'ADN participant à la transformation de ces cellules.

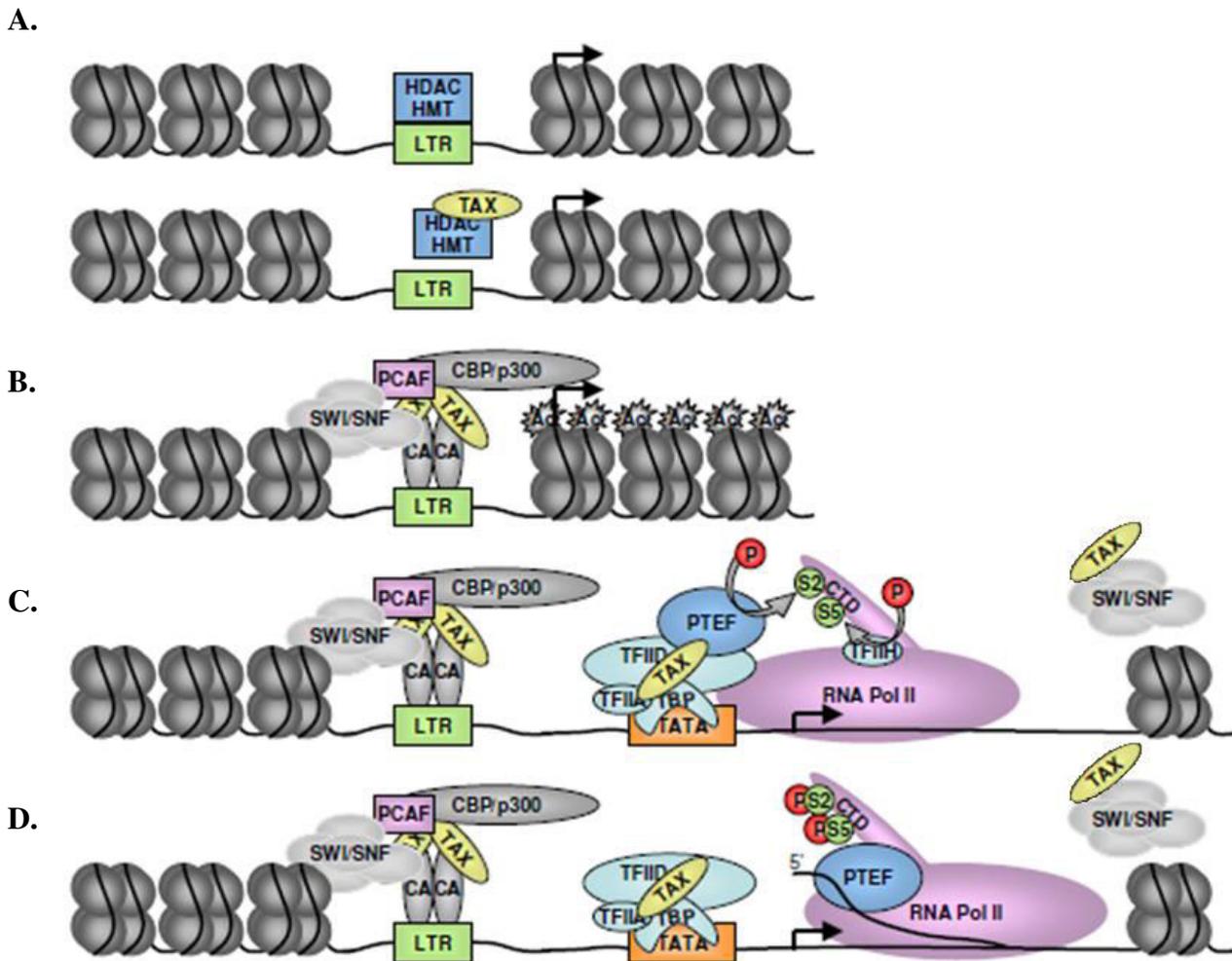


FIGURE 37 : Modèle d'activation de la transcription virale induite par Tax au niveau des LTR proviraux.

Représentation schématique de l'activation de la transcription du génome proviral induite par le recrutement des différents acteurs de la transcription cellulaire par Tax au niveau du LTR. (A.) Tax lève la répression transcriptionnelle des LTR en interagissant directement avec l'histone déacétylase HDAC-1 et/ou avec des histones méthyltransférases (HMT). (B.) Tax recrute les facteurs de transcription CREB/ATF (CA), ainsi que les enzymes de modifications des histones (CBP/p300 et PCAF) et de remodelage de la chromatine (le complexe SWI/SNF). (C.) Tax favorise la fixation des facteurs de transcription TFIIA et TFIID, composé des sous-unités TAFII28 et TBP, au niveau de la boîte TATA du LTR, qui induisent ensuite le recrutement de l'ARN polymérase II (RNA Pol II). (D.) Une fois que le complexe d'initiation est formé, Tax recrute le facteur P-TEFb, qui phosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (CTD), provoquant l'élongation de la transcription. L'interaction de Tax avec le complexe SWI/SNF, en amont de la polymérase, prévient l'arrêt de l'élongation. D'après (Boxus et al., 2008).

III.1.2. Tax détourne des acteurs cellulaires impliqués dans des processus biologiques clés

a) Tax cible les acteurs de la transcription favorisant l'expression de gènes viraux et cellulaires

Chez les eucaryotes, l'initiation et l'élongation de la transcription des gènes demandent de nombreuses étapes dont la décondensation locale de la chromatine, le remodelage des nucléosomes et la modification des histones, ainsi que le recrutement et la fixation, sur les promoteurs, de facteurs de transcription et de co-activateurs (Smale and Kadonaga, 2003). La protéine Tax interfère avec la plupart de ces mécanismes, en détournant au niveau des LTR du génome proviral, les protéines cellulaires impliquées afin d'activer l'expression virale (Curren et al., 2012) (**FIGURE 37**).

Tax favorise tout d'abord l'acétylation des histones, en interagissant avec l'histone déacétylase HDAC-1, ce qui l'empêche de se lier au LTR viral ou l'en dissocie si elle est déjà présente. De cette façon Tax lève la répression transcriptionnelle au niveau des promoteurs viraux (Lu et al., 2004) (**FIGURE 37A**). La méthylation des histones participant également à la répression transcriptionnelle, Tax peut en outre interagir avec des histones méthyltransférases (HMT) ou des histones déméthylases (HDM) pour permettre l'expression des promoteurs du HTLV-1 (Boxus et al., 2008).

Après cette étape, Tax, qui ne peut se lier directement à l'ADN, recrute les facteurs de transcription cellulaires CREB/ATF, pour qu'ils se fixent au niveau des éléments TRE-1 (*Tax Response Element*) de la région U3 du LTR (Kim et al., 2010; Zhao and Giam, 1992) (**FIGURE 37B**). Ces éléments, qui sont au nombre de trois et font 21bp chacun, sont composés d'un motif octamérique [TGACG(T/A)(C/G)(T/A)], entouré en 5' d'une séquence riche en G et en 3' d'une séquence riche en C. Ce motif est proche de la séquence [TGACGTCA] située dans les éléments CRE (*cAMP Response Element*) de promoteurs cellulaires, auxquels se lient les facteurs CREB/ATF (Brady et al., 1987; Jeang et al., 1988).

Par ailleurs, la dimérisation des protéines Tax est nécessaire pour le recrutement des facteurs CREB/ATF, ainsi que pour l'activation optimale des promoteurs viraux (Jin and Jeang, 1997; Tie et al., 1996). La protéine Tax, en interagissant avec les facteurs CREB/ATF, au niveau de leur domaine caractéristique bZIP (*basic-region leucine Zipper*), induit également leur dimérisation puis leur fixation aux éléments TRE-1 du LTR viral (Wagner and Green, 1993) (**FIGURE 37B**).

D'autre part, les contacts entre Tax et le petit sillon de l'ADN, au niveau des séquences riches en G et en C qui entourent le motif des éléments TRE-1, contribuent à la stabilisation du tétramère Tax/CREB/ATF sur le LTR (Kimzey and Dynan, 1998; Lundblad et al., 1998).

Suite à cette stabilisation, la protéine Tax recrute les co-activateurs cellulaires CBP/p300 et PCAF (*p300/CBP Associated Factor*), qui ont une activité histone acétylase (Harrod et al., 2000) (**FIGURE 37B**). Récemment, de nouveaux co-activateurs, correspondant aux protéines TORC-1, 2 et 3 (*Transducer Of Regulated CREB activity*), ont été mis en évidence comme étant mobilisés par Tax au niveau du promoteur viral et comme étant nécessaires à l'activation de la transcription (Koga et al., 2004; Siu et al., 2006).

Tax recrute également le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (*Switch/Sucrose Non Fermentable*), en interagissant avec plusieurs de ses sous-unités, dont BGR1. Ce complexe permet le déplacement des nucléosomes pour faciliter l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs viraux lors de l'initiation, mais aussi l'accès de l'ARN polymérase II à l'ADN durant la phase d'élongation (Easley et al., 2010) (**FIGURE 37B à D**).

L'ensemble des protéines recrutées par Tax au niveau des promoteurs viraux permet au final la décondensation de la chromatine au niveau de cette région, favorisant l'arrivée de la machinerie de transcription cellulaire, dont le facteur TFIID et l'ARN polymérase II (Lu et al., 2002) (**FIGURE 37C**).

La protéine Tax se lie en effet directement aux sous-unités TAFII28 (*TBP-Associated Factor II 28*) et TBP (*TATAA-Binding Protein*) du facteur TFIID, ainsi qu'au facteur TFIIA, conduisant à leur recrutement au niveau de la boîte TATA du promoteur viral (Caron et al., 1993, 1997; Clemens et al., 1996). Ces facteurs TFII constituent le complexe de préinitiation de la transcription, à l'origine du recrutement de l'ARN polymérase II.

Enfin, une fois que l'ensemble des protéines formant le complexe d'initiation ont été rassemblées au niveau du promoteur viral, Tax recrute le facteur P-TEFb (*Positive-Transcription Elongation Factor b*) en se fixant à ses sous-unités, correspondant à la kinase CDK9 (*Cyclin-Dependent Kinase 9*) et à la cycline T1 (Zhou et al., 2006). Ce facteur P-TEFb phosphoryle la sérine 2 du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II, assurant ainsi l'élongation de la transcription effectuée par cette enzyme (Cho et al., 2007) (**FIGURES 37C et D**). L'interaction de Tax avec le complexe SWI/SNF, en amont de l'ARN polymérase II, garantit aussi cette élongation.

Dernièrement, une étude a par ailleurs démontré qu'un autre facteur d'élongation, le facteur ELL2, était modulé par Tax. En effet, Tax augmente spécifiquement l'expression de ce facteur, contribuant ainsi à l'activation de la transcription des gènes viraux (Mann et al., 2014).

En détournant ces différents éléments essentiels au déroulement de la transcription, la protéine Tax favorise l'expression du génome proviral du HTLV-1, nécessaire à sa réplication. Par ailleurs, ce mécanisme va également déréguler l'expression de gènes cellulaires, dont la transcription dépend des facteurs et des co-activateurs mobilisés par Tax.

Il a en effet été décrit que Tax induit l'expression de plusieurs gènes cellulaires, comme ceux codant pour l'IL-17 ou c-fos, grâce à son interaction avec les facteurs CREB/ATF (Alexandre and Verrier, 1991; Dodon et al., 2004), tandis que le recrutement de ces facteurs par Tax entraîne une activité répressive sur d'autres promoteurs cellulaires, comme ceux des gènes codant pour la cycline A et D3 ou pour l'ADN polymérase α (Kibler and Jeang, 2001). Cette répression pourrait notamment s'expliquer par un mécanisme de compétition pour le recrutement des co-activateurs CBP/p300, au niveau des promoteurs cellulaires activés par des facteurs de transcription ayant beaucoup ou, au contraire, peu d'affinité avec Tax, comme le facteur p53 (Boxus et al., 2008).

D'autre part, Tax peut interagir avec d'autres facteurs de transcription, comme AP-1 (*Activator Protein-1*) (Iwai et al., 2001) ou SRF (*Serum Response Factor*) (Winter and Marriott, 2007), mais également les facteurs NF- κ B, qui ont été décrits précédemment. Cette diversité d'interactions avec les facteurs de transcription permet ainsi à la protéine Tax de réguler l'expression de centaines de gènes dans les cellules infectées (Pise-Masison et al., 2002). Ces effets de Tax sur l'expression cellulaire ont donc une place importante dans la dérégulation des processus biologiques des cellules infectées par HTLV-1, conduisant à leur immortalisation et à leur transformation.

b) Tax cible les acteurs du cycle cellulaire et de l'apoptose favorisant l'immortalisation des cellules

Afin d'assurer la prolifération et la survie des cellules infectées, la protéine Tax dérégule des protéines essentielles pour le cycle cellulaire et l'apoptose.

Le cycle cellulaire est constitué de quatre phases : une phase G1 de croissance et de préparation à la réplication, une phase S de réplication de l'ADN, une phase G2 de croissance et de préparation à la mitose et enfin, une phase M de mitose, correspondant à la division de la cellule mère en deux cellules filles identiques (**FIGURE 38**).

La progression du cycle cellulaire est contrôlée par différentes kinases CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) associées à des cyclines, qui régulent leur activité (Lobjois, 2005; Vermeulen et al., 2003).

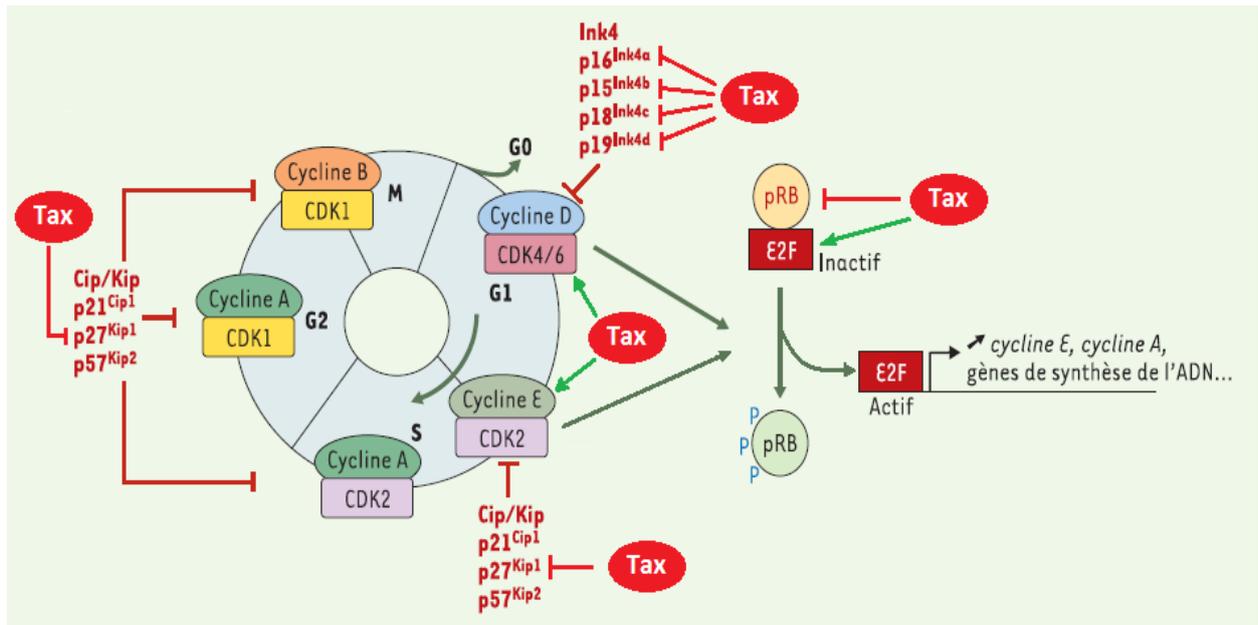


FIGURE 38 : La protéine Tax dérégule différents acteurs contrôlant la transition G1/S du cycle cellulaire.

Représentation du cycle cellulaire eucaryote, composé de quatre phases G1, S, G2 et M. La progression entre chaque phase est contrôlée par différents complexes CDK/cycline. La transition G1/S est régulée par les complexes CDK(4/6)/cycline D, qui déclenchent la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB), et est poursuivie en fin de phase G1 par les complexes CDK2/cycline E. Sous sa forme hyperphosphorylée, pRB devient inactive et libère le facteur de transcription E2F, permettant ainsi l'expression des gènes essentiels à la transition G1/S, dont le gène cycline E. La protéine virale Tax dérégule différentes protéines contrôlant ce passage de la phase G1 à S : elle stimule d'une part l'expression ou l'activité d'activateurs du cycle (symbolisés par les flèches vertes) et d'autre part elle bloque l'expression ou l'activité des inhibiteurs (illustrés par les flèches rouges). D'après (Lobjois, 2005).

L'activité des complexes CDK/cycline est inhibée par deux familles d'inhibiteurs de CDK: la famille des protéines Ink4 (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} et p19^{Ink4d}) qui est spécifique des complexes CDK(4/6)/cycline D et les protéines de la famille Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) qui agissent sur tous les complexes CDK/cycline.

L'une des étapes cruciales du cycle cellulaire est le passage de la phase G1 à la phase S, permettant l'entrée en prolifération des cellules. En effet, l'entrée en phase S est caractérisée par la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB), permettant la libération du facteur de transcription E2F qui lui est associé et qui peut alors activer l'expression de gènes cellulaires nécessaires pour la transition G1/S (**FIGURE 38**). La protéine Tax cible spécifiquement cette étape et provoque une accélération de la phase G1, sans changement de la durée de la phase S, dans les cellules infectées qui paraissent alors plus petites (Lemoine and Marriott, 2001). Cette accélération est due à la dérégulation induite par Tax de plusieurs protéines contrôlant cette transition (**FIGURE 38**).

La protéine Tax active notamment l'expression des cyclines D1 et D2, impliquées dans le passage G1/S (Akagi et al., 1996; Huang et al., 2001; Kim et al., 2010) (**FIGURE 38**). Cette surexpression, qui a été constatée dans des cellules de patients infectés par HTLV-1, favorise l'association de la cycline D2 avec la kinase CDK6 habituelle, mais également avec les kinases CDK4 ou CDK2 (Santiago et al., 1999).

Tax est en outre capable de moduler l'expression de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la transition G1/S, notamment en activant la voie NF- κ B. Tax peut en effet activer l'expression des kinases CDK2, 4 et 6 ainsi que de la cycline E et du facteur de transcription E2F, tandis qu'elle réprime l'expression des inhibiteurs p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d} et p27^{Kip1} (Akagi et al., 1996; Iwanaga et al., 2001) (**FIGURE 38**).

Par ailleurs, Tax peut interagir directement avec les complexes CDK/cycline D, favorisant leur activité et la phosphorylation de la protéine pRB, entraînant un changement de sa conformation à l'origine de la libération du facteur E2F (Neuveut et al., 1998). Une étude a d'ailleurs montré que Tax se liait à CDK4, ce qui facilitait son association avec la cycline D, induisant une augmentation de son activité kinase (Haller et al., 2002).

La protéine Tax peut d'autre part interagir avec les inhibiteurs p16^{Ink4a} et p15^{Ink4b}, ce qui conduit à leur inactivation (Low et al., 1997; Suzuki et al., 1996, 1999).

Enfin, Tax se fixe directement à la protéine pRB hypophosphorylée, qui séquestre E2F, et induit sa dégradation par le protéasome cellulaire (Kehn et al., 2005) (**FIGURE 38**).

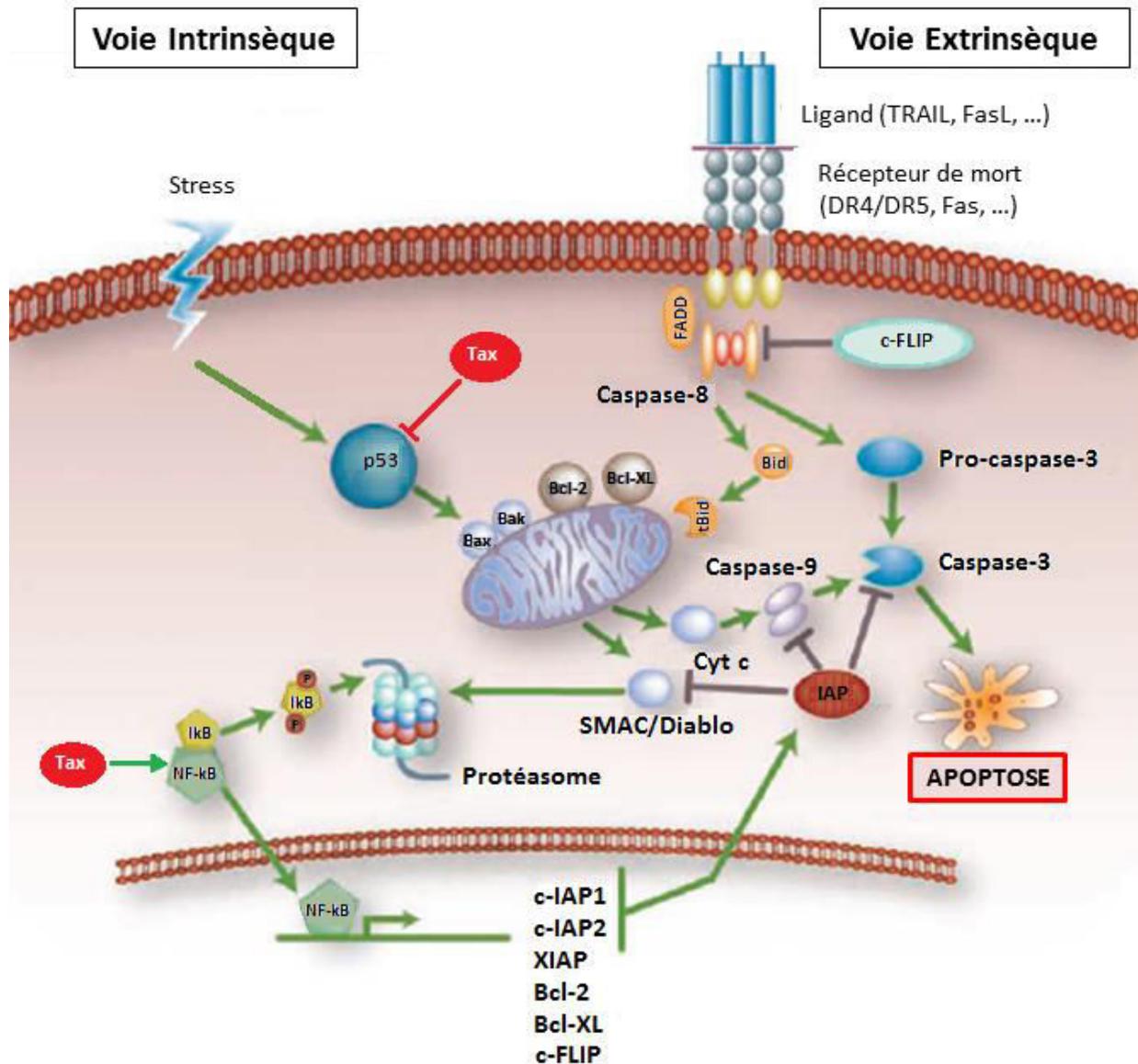


FIGURE 39 : La protéine Tax dérègle différents acteurs médiant l'apoptose.

Représentation schématique des voies intrinsèques ou mitochondriales et extrinsèques de l'apoptose. La voie intrinsèque fait intervenir notamment le facteur de transcription p53, qui est activé suite à la détection d'un stress cellulaire (dommages à l'ADN, dérégulation du cycle,...), tandis que la voie extrinsèque passe par des récepteurs de mort (DR4/DR5, Fas,...). La protéine virale Tax dérègle ces deux voies, et plus spécifiquement la voie intrinsèque, en activant l'expression de molécules anti-apoptotiques comme IAP (c-IAP1 c-IAP2, XIAP), Bcl-XL ou encore c-FLIP, via l'activation de la voie NF-κB. Tax réprime par ailleurs l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bim ou Bid, qui sont régulées par le facteur p53. Tax cible donc préférentiellement p53 pour inhiber l'effet pro-apoptotique et garantir la progression du cycle cellulaire ainsi que la survie des cellules infectées par HTLV-1. D'après (de Vries, 2006).

En accélérant le passage en phase S des cellules infectées par HTLV-1, Tax favorise donc la prolifération excessive et incontrôlée de ces cellules. Plus récemment, une étude a prouvé qu'une fois la transition G1/S réalisée, Tax pouvait augmenter le nombre d'origines de réplication activées en début de phase S, en recrutant notamment l'histone acétylase p300 et le complexe hélicase MCM2-7 (*Mini-Chromosome Maintenance proteins 2-7*). Grâce à ces protéines, Tax modifie le programme temporel de la réplication, en rendant accessible des origines de réplication normalement tardives, par hyperacétylation des histones (Boxus et al., 2012). Ce mécanisme participe à l'augmentation du taux de réplication des cellules infectées, ainsi qu'à l'accélération de la phase S.

Parallèlement aux dérèglements du cycle cellulaire, Tax favorise l'inhibition de l'apoptose dans les cellules infectées, induisant ainsi la persistance virale et l'immortalisation de ces cellules. Comme pour le cycle cellulaire, Tax détourne différents composants de la machinerie anti-apoptotique ou pro-apoptotique, assurant un contrôle efficace sur l'ensemble de ce processus (**FIGURE 39**). En effet, la protéine Tax est capable d'activer l'expression de nombreuses molécules anti-apoptotiques telles Bcl-XL (Mori et al., 2001), IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) (Kawakami et al., 1999; Wäldele et al., 2006), c-FLIP (*cellular FLICE-Like Inhibitory Protein*) (Krueger et al., 2006), CXCR7 (Jin et al., 2009b), ou encore Bcl-3 (Saito et al., 2010). A l'inverse, Tax réprime l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bax (Brauweiler et al., 1997), ou encore Bim et Bid (Mühleisen et al., 2014) (**FIGURE 39**). De façon intéressante, une grande partie des régulations induites par Tax passe par l'activation de facteurs NF- κ B.

Dernièrement, une étude a mis en évidence la dérégulation de la voie de l'autophagie dans des cellules exprimant Tax, entraînant une protection de ces cellules contre l'apoptose induite via la voie extrinsèque. Cette dérégulation a été montrée comme passant par l'activation du complexe IKK de la voie NF- κ B (Wang et al., 2014).

Tax est capable d'inhiber les deux voies de l'apoptose, correspondant à la voie intrinsèque ou mitochondriale, activée principalement suite à un stress cellulaire, et à la voie extrinsèque, activée par la liaison de ligands extracellulaires au niveau de récepteurs de mort (Fas, CD95, DR4 ou DR5 par exemple). Toutefois, une étude a montré que Tax protégeait essentiellement les cellules contre la voie intrinsèque (Saggioro et al., 2001), ce qui est également suggéré par le fait que Tax détourne un plus grand nombre de protéines impliquées dans la voie intrinsèque que dans la voie extrinsèque (**FIGURE 39**).

La voie intrinsèque de l'apoptose passe notamment par l'activation du facteur de transcription p53. Cette protéine, fréquemment mutée dans les cancers humains, est activée en cas de stress, qui peut correspondre à des dommages dans l'ADN ou à une dérégulation du cycle cellulaire, et va induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN (Vogelstein et al., 2000).

Tax cible donc préférentiellement ce suppresseur de tumeur p53 dans les cellules, afin de favoriser leur survie (**FIGURE 39**). Pour cela, Tax utilise principalement deux mécanismes conduisant à l'inactivation de p53, sans que l'oncoprotéine virale n'interagisse avec ce facteur ou qu'elle n'empêche sa fixation à l'ADN (Mulloy et al., 1998b).

Le premier mécanisme est basé sur une compétition entre Tax et p53 pour le recrutement des co-activateurs CBP/p300, essentiels aux deux protéines pour qu'elles induisent la transcription de leurs gènes cellulaires cibles. Il a en effet été décrit que Tax pouvait inhiber l'interaction entre p53 et CBP *in vitro* (Ariumi et al., 2000). Le deuxième mécanisme correspond à l'induction d'une interaction entre p53 phosphorylé et RelA, basée sur l'activation de la sous-unité catalytique IKK β du complexe IKK par Tax. En activant IKK β , Tax induit la phosphorylation de RelA, qui peut alors interagir avec p53 phosphorylé, localisé au niveau de ses promoteurs cibles, entraînant ainsi la stabilisation et l'inactivation du suppresseur de tumeur (Jeong et al., 2004, 2005b). En effet, la phosphorylation de p53 a été décrite comme inhibant son interaction avec les facteurs de transcription, dont TFIID (Pise-Masison et al., 1998). Des études récentes ont également montré que Tax coopérait avec le facteur Wip1 (*Wild-type p53-induced phosphatase 1*) pour favoriser l'inactivation de p53 et que ces protéines Tax et Wip1 pouvaient interagir (Dayaram et al., 2013; Zane et al., 2012a).

Il faut par ailleurs noter que la protéine Tax2 du virus HTLV-2 peut inhiber p53, mais avec une efficacité moins importante que la protéine Tax1 du HTLV-1, suivant les sous-types moléculaires d'HTLV-2 (Mahieux et al., 2000; Romanelli et al., 2013). Ces variations pourraient participer aux différences de pathogenèse constatées entre HTLV-1 et HTLV-2.

En dérégulant les acteurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, Tax favorise donc la prolifération et la survie des cellules infectées par HTLV-1, conduisant à leur immortalisation. Ces étapes sont cruciales dans l'établissement d'un phénotype transformé, puisqu'elles participent à l'apparition et à l'accumulation d'anomalies génomiques dans l'ADN cellulaire. La protéine Tax peut, en outre, contribuer directement à l'apparition de ces anomalies, en modulant les protéines garantes de l'intégrité du génome, dont notamment celles impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN.

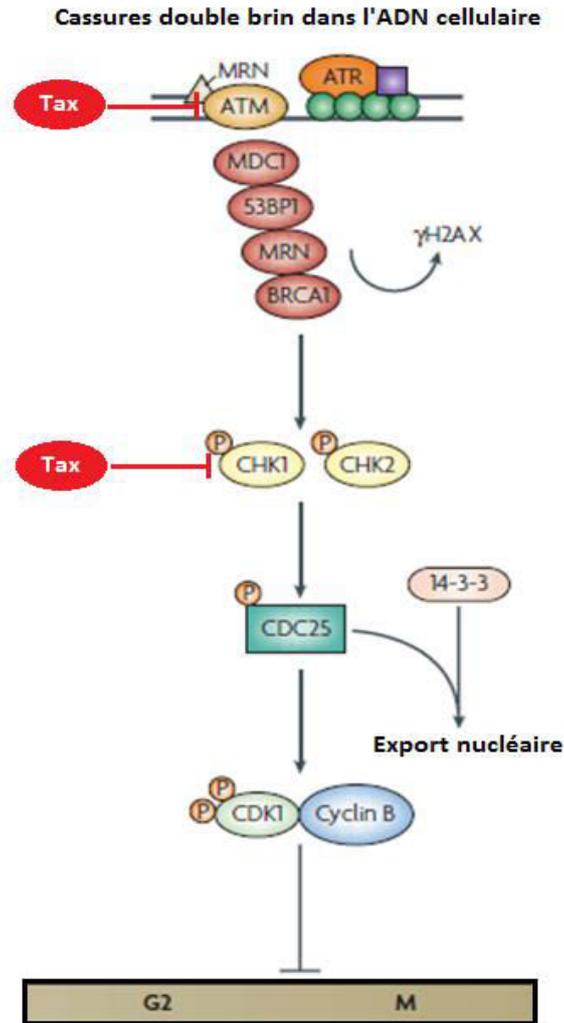


FIGURE 40 : La protéine Tax dérégule le point de contrôle de la transition G2/M, favorisant l'accumulation des anomalies génomiques.

Représentation schématique des molécules impliquées dans le point de contrôle du passage de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire. La protéine kinase ATM est activée par la présence de cassures double brin dans l'ADN, entraînant l'activation par phosphorylation des kinases CHK1 et CHK2. La phosphatase CDC25 est alors inactivée par CHK1 et 2, entraînant le maintien de la phosphorylation sur le complexe CDK1/cycline B, qui ne peut induire la transition G2/M. La protéine virale Tax bloque les kinases ATM, CHK1 et 2, favorisant le passage en phase M des cellules, malgré la présence de cassures double brin dans leur ADN. D'après (Löbrich and Jeggo, 2007).

c) Tax cible les acteurs du maintien de l'intégrité génomique favorisant la transformation des cellules

Des anomalies génétiques, correspondant à des mutations, des insertions ou des délétions de gènes, ainsi que des anomalies chromosomiques, touchant le nombre ou la structure des chromosomes, sont retrouvées chez la plupart des patients atteints d'ATLL (Itoyama et al., 1990; Matsuoka and Jeang, 2007; Whang-Peng et al., 1985). La protéine Tax a été identifiée comme étant impliquée dans la survenue de ces anomalies (Lemoine and Marriott, 2002; Miyake et al., 1999). L'un des mécanismes majeurs entraînant l'accumulation des anomalies génomiques dans les cellules infectées par HTLV-1 est l'inhibition des machineries de détection et de réparation des dommages à l'ADN par la protéine Tax (Matsuoka and Jeang, 2011).

Des études ont en effet montré que Tax pouvait inhiber les différentes voies de réparation de l'ADN cellulaire. Ainsi, Tax réprime la réparation par excision de nucléotides (NER, *Nucleotide Excision Repair*), qui permet de diminuer les lésions bloquant l'ADN polymérase au cours de la réplication de l'ADN (Kao and Marriott, 1999; Lemoine et al., 2000). Tax peut en outre bloquer la réparation de l'ADN par excision de bases (BER, *Base Excision Repair*), en inhibant l'ADN polymérase β qui corrige les cassures simple brin ou les bases endommagées dans l'ADN (Jeang et al., 1990; Philpott and Buehring, 1999). D'autre part, la répression de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le processus de réparation des mésappariements (MMR, *Mismatch Repair*) a également été mise en évidence dans des cellules de sujets ATLL, sans pour autant montrer l'implication directe de Tax (Morimoto et al., 2005). Enfin, Tax est capable de séquestrer, au niveau de corps nucléaires, les facteurs BRCA-1 (*Breast Cancer-1*), MDC1 (*Mediator of DNA-damage Checkpoint 1*) et DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*), impliqués dans les deux processus de réparation des cassures double brin de l'ADN, correspondant à la recombinaison homologue (RH) et à la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*), permettant ainsi d'empêcher l'action de ces facteurs (Belgnaoui et al., 2010). Tax réprime également l'expression d'une autre protéine intervenant dans la voie de réparation NHEJ, le facteur Ku80 (Ducu et al., 2011; Majone et al., 2005).

Par ailleurs, Tax bloque les protéines intervenant dans la détection des cassures double brin de l'ADN, conduisant normalement à l'inhibition de la transition G2/M du cycle cellulaire (**FIGURE 40**). En effet, Tax interagit avec les kinases CHK1 et CHK2 inhibant ainsi leur activité, essentielle pour maintenir le complexe CDK1/cycline B phosphorylé et empêcher la transition G2/M (Park et al., 2004, 2006) (**FIGURE 40**).

Il a également été démontré que Tax inhibait la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), qui phosphoryle et active CHK1 et 2 (Chandhasin et al., 2008). Avec ces mécanismes, Tax favorise donc le passage des cellules en mitose, malgré la présence d'anomalies au niveau de leur ADN (**FIGURE 40**).

Grâce à l'inactivation de différentes protéines impliquées dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN, Tax favorise l'accumulation et la persistance de lésions dans le génome, conduisant à l'émergence d'un phénotype transformé.

Récemment, Tax a, en outre, été mise en évidence comme pouvant induire la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) dans les cellules infectées par HTLV-1, qui sont capables de créer directement des dommages dans l'ADN (Choi and Harhaj, 2014a; Kinjo et al., 2010).

De façon intéressante, l'inhibition de la réparation des cassures double brin par Tax favorise l'apparition de chromosomes structurellement anormaux. La présence de nombreuses extrémités 3'-OH non protégées et accessibles au niveau de ces cassures double brin, dans les micronucléi formés en présence de Tax, facilite par ailleurs les remaniements chromosomiques (Majone and Jeang, 2000). Des études ont également montré que Tax coopérait avec le facteur TAL1 (*T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1*), afin de réprimer l'expression du gène codant pour la sous-unité catalytique hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) de la télomérase, inhibant ainsi cette enzyme (Gabet et al., 2003; Terme et al., 2009; Zane et al., 2012b). Les télomères situés aux extrémités des chromosomes sont alors raccourcis, ce qui contribue à leur fusion.

Enfin, Tax a été associée à l'induction de l'aneuploïdie dans les cellules infectées par HTLV-1, causée par des défauts de ségrégation des chromosomes durant la mitose. Tax est en effet capable de moduler différentes protéines cellulaires impliquées dans la constitution et la mise en place du fuseau mitotique, indispensable à la bonne ségrégation des chromosomes. Les centrosomes sont des éléments clés de ce fuseau et sont particulièrement ciblés par Tax, qui dérégule leur duplication, induisant l'aneuploïdie (Afonso et al., 2007b).

Tax interagit notamment avec la protéine RanBP1 au niveau des centrosomes, qui contrôle la formation des fuseaux mitotiques, modifiant ainsi son activité et provoquant une multiplication anormale et une fragmentation des centrosomes (Peloponese et al., 2005). La protéine Tax interagit, en outre, avec TAX1BP2, inhibant son activité de contrôle de la réplication des centrosomes (Ching et al., 2006; Pumfery et al., 2006). Enfin, Tax peut se lier aux protéines HsMad1 et HsMad2 au niveau des centrosomes, qui sont deux facteurs impliqués dans le point de contrôle du fuseau mitotique au cours de la phase M du cycle cellulaire (Jin et al., 1998).

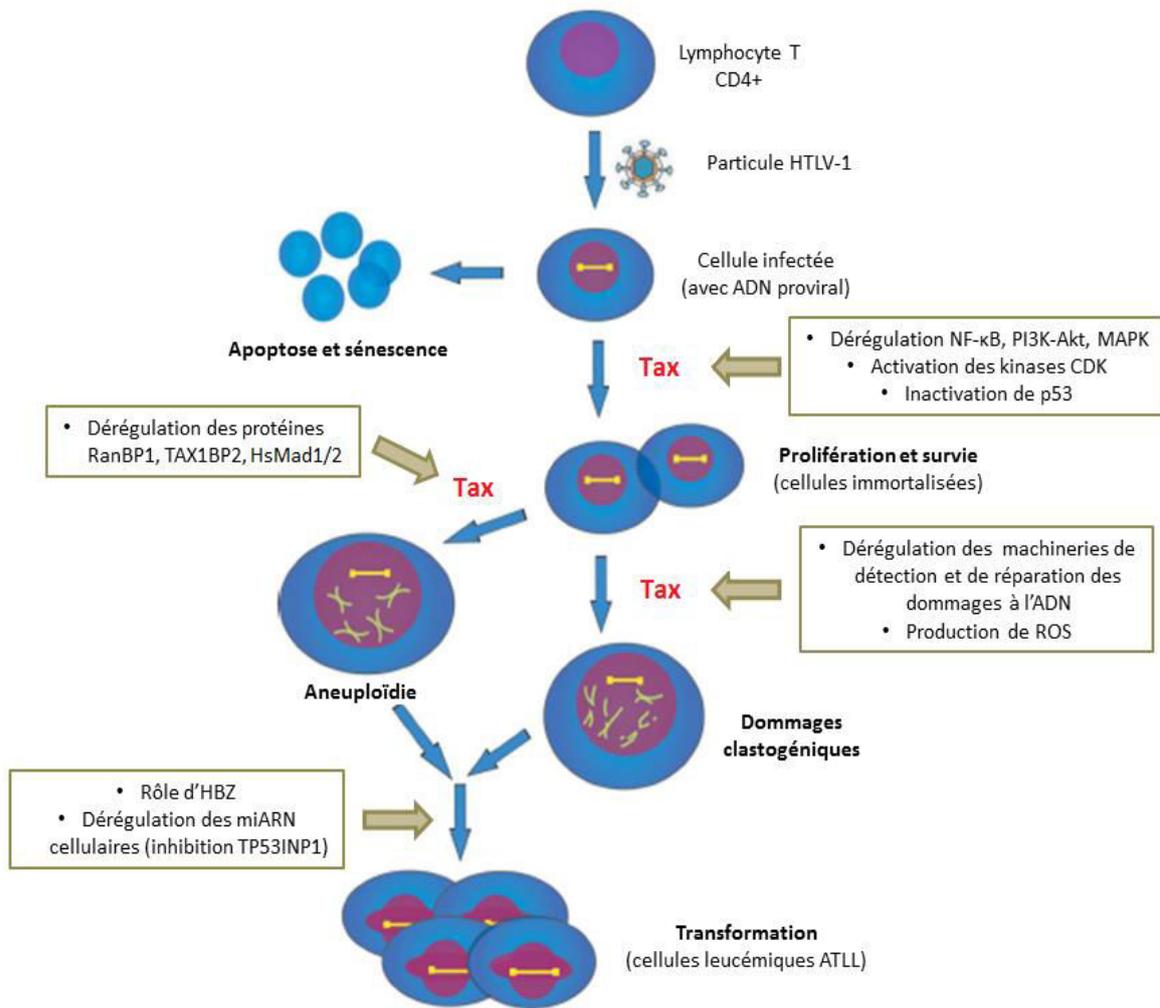


FIGURE 41 : Modèle des différents événements et dérégulations induites par Tax conduisant à l'immortalisation et à la transformation des cellules infectées par HTLV-1.

L'expression de la protéine Tax dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1 entraîne la dérégulation de multiples voies de signalisation cellulaires, dont NF-κB, PI3K-Akt ou MAPK, ainsi que d'un grand nombre de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, comme les kinases CDK, ou de l'apoptose, comme le facteur p53. Tous ces événements favorisent la prolifération et la survie des cellules infectées, à l'origine de leur immortalisation. Par ailleurs, Tax module l'activité de nombreux acteurs du maintien de l'intégrité génomique, comme les protéines intervenant dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN ou les protéines RanBP1, TAX1BP2 et HsMad1/2, contrôlant la duplication des centrosomes et la bonne mise en place du fuseau mitotique. Ces dérèglements conduisent à l'aneuploïdie et à l'accumulation de dommages clastogéniques, participant à l'installation d'un phénotype transformé dans les cellules immortalisées, qui peuvent proliférer indépendamment de l'expression de Tax. Enfin, la protéine virale HBZ et son action sur la multiplication des cellules notamment, ainsi que des dérégulations au niveau de l'expression des miARN cellulaires, contribuant entre autre à l'inhibition du suppresseur de tumeur TP53INP1, achèvent la transformation définitive des cellules en cellules leucémiques ATLL. D'après (Matsuoka and Jeang, 2011).

Le recrutement de ces facteurs inhibe leur fonction et les empêche d'arrêter la mitose en présence d'anomalies du fuseau, favorisant ainsi une ségrégation anormale des chromosomes (Jin et al., 1998).

La protéine Tax contribue donc à l'induction d'une instabilité génomique dans les cellules infectées par HTLV-1, en favorisant l'aneuploïdie et la survenue de dommages clastogéniques majeurs, à travers la dérégulation de nombreux acteurs impliqués dans le maintien de l'intégrité génomique (**FIGURE 41**). L'accumulation de ces événements participe à l'acquisition d'un phénotype transformé dans ces cellules, ainsi qu'à leur capacité à proliférer en l'absence de Tax (**FIGURE 41**).

Dans un deuxième temps, l'expression de la protéine HBZ, qui induit notamment la réactivation des fonctions de la sous-unité catalytique hTERT et favorise la prolifération des cellules immortalisées (Terme et al., 2009), ainsi que des changements au niveau de l'expression des miARN cellulaires, entraînant entre autre l'inhibition du suppresseur de tumeur TP53INP1 (Yamagishi and Watanabe, 2012; Yeung et al., 2008), permet la transformation définitive et complète des cellules infectées par HTLV-1 en cellules leucémiques, contribuant au développement de l'ATLL (Matsuoka and Jeang, 2011) (**FIGURE 41**).

III.2. Les caractéristiques structurelles et la localisation de Tax sont adaptées à ses fonctions

III.2.1. Localisation subcellulaire de la protéine Tax

La protéine Tax du virus HTLV-1 est présente dans différents compartiments cellulaires et est sujette à un trafic important entre le noyau et le cytoplasme des cellules, afin d'interagir avec ses multiples partenaires et de moduler ses effets pléiotropiques, pour favoriser la réplication et la persistance virale (Alefantis et al., 2005a; Bertazzoni et al., 2011). Tax n'est pas localisée de façon homogène dans le noyau ou le cytoplasme, mais elle s'organise essentiellement sous forme de structures spécifiques, primordiales pour ses fonctions (Lodewick et al., 2011).

Dans le cytoplasme, Tax peut être distribuée de manière diffuse ou ponctuelle au niveau de deux types de structures.

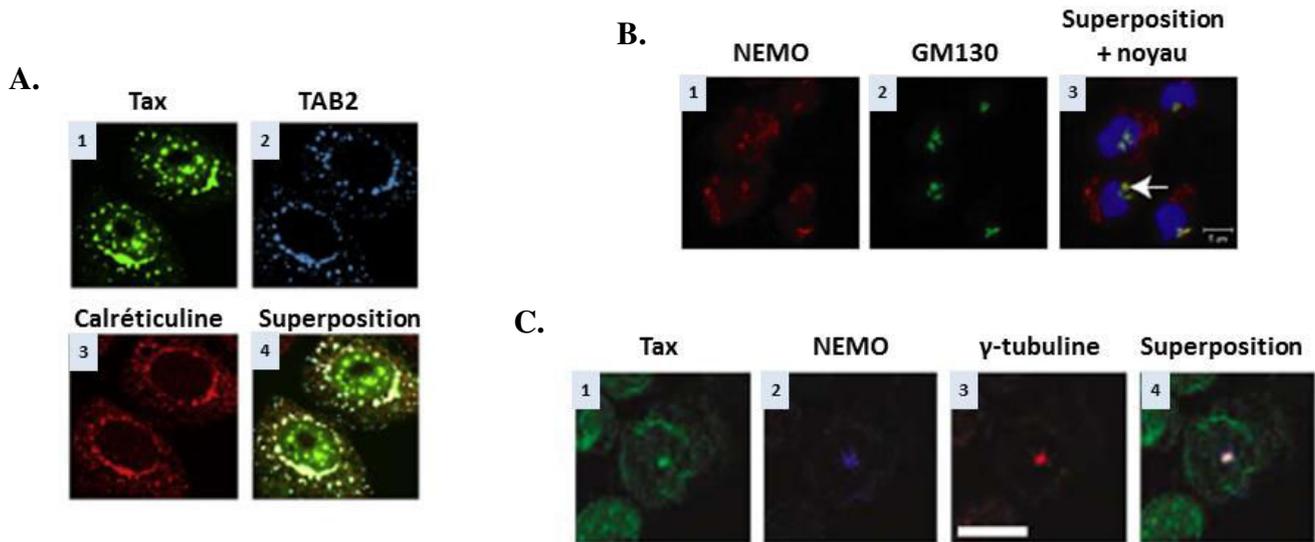


FIGURE 42 : La protéine Tax est localisée dans des granules cytoplasmiques et dans des compartiments périnucléaires.

- A. Visualisation des granules cytoplasmiques contenant (1) Tax, (2) TAB2 et (3) la calréticuline dans des cellules Hep2, co-transfectées avec Tax-HA et TAB2-Flag. D'après (Avesani et al., 2010).
- B. Visualisation du compartiment périnucléaire, accolé au noyau et formé en présence de Tax dans des cellules C8166 exprimant une protéine Tax endogène. Le compartiment est associé à l'appareil de Golgi, dont la protéine GM130 est marquée en vert (2) et NEMO est recrutée au niveau de cette structure (1). (3) La colocalisation entre GM130 et NEMO au niveau du compartiment périnucléaire est indiquée par la flèche blanche. D'après (Harhaj et al., 2006).
- C. Visualisation du compartiment périnucléaire contenant (1) Tax et (2) NEMO, dans des cellules C8166. (3) Le compartiment est associé au centrosome représenté par la protéine γ -tubuline. D'après (Kfoury et al., 2008).

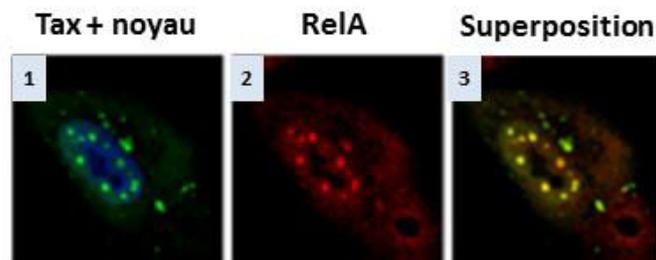


FIGURE 43 : La protéine Tax est localisée dans des corps nucléaires spécifiques.

Visualisation des corps nucléaires Tax contenant (1) Tax et (2) le facteur RelA, au niveau du noyau de cellules HeLa transfectées avec Tax. D'après (Bonnet et al., 2012).

La première correspond à des granules, situées dans l'ensemble du cytoplasme, et plus particulièrement, en périphérie du noyau. Ces granules contiennent la protéine Tax liée à la calréticuline, permettant sa rétention cytoplasmique, ainsi que des membres de la voie NF- κ B, comme les protéines TAB2 ou NEMO (Alefantis et al., 2007; Avesani et al., 2010) (**FIGURE 42A**). Ces structures pourraient donc favoriser l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax, en regroupant les différents acteurs nécessaires à ce processus.

Toutefois, des études ont montré que c'est majoritairement au niveau d'une deuxième structure concentrant Tax, qui a été identifiée dans le cytoplasme, que l'activation de la voie NF- κ B a lieu. Cette structure est un compartiment périnucléaire, qui est associé à l'appareil de Golgi ainsi qu'au centrosome et est accolé à l'enveloppe nucléaire (Nejmeddine et al., 2005) (**FIGURES 42B et C**). Le recrutement du complexe IKK par Tax a en effet été constaté au niveau de ce compartiment, témoignant de son rôle central dans l'activation de la voie NF- κ B (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008). La protéine Tax a été plus précisément localisée dans les radeaux lipidiques des membranes de l'appareil de Golgi (Huang et al., 2009).

Tax est par ailleurs située de façon importante au niveau du noyau, pour pouvoir notamment réguler l'expression du génome proviral ainsi que celle d'autres gènes cellulaires. Les premières observations de la protéine virale dans le noyau ont permis de constater que Tax était absente du nucléole et qu'elle se concentrait en structures, qui ont tout d'abord été qualifiées de TSS (*Tax-Speckled Structures*) (Semmes and Jeang, 1996). Ces TSS font parties du réseau de corps nucléaires qui occupe l'espace interchromatinien du noyau (Mao et al., 2011). Elles ont été assimilées au départ à un autre type de corps nucléaires, les complexes de granules interchromatiniennes (IGC, *Interchromatin Granule Clusters* ou NS, *Nuclear Speckles*), avant d'être plus précisément caractérisées et définies comme des corps nucléaires spécifiques de Tax (Bex et al., 1997) (**FIGURE 43**).

De nombreuses protéines sont retrouvées dans ces corps nucléaires Tax, appartenant entre autre aux machineries de transcription, d'épissage, de réparation des dommages à l'ADN ou encore de réplication (Belgnaoui et al., 2010; Bex et al., 1997; Boxus et al., 2012). D'autre part, la présence des facteurs p50, RelA ou encore NEMO, au niveau de ces corps nucléaires, suggérait un rôle de ces structures dans l'activation transcriptionnelle de la voie NF- κ B induite par Tax (Bex et al., 1997; Lamsoul et al., 2005) (**FIGURE 43**). Cependant, notre laboratoire a prouvé récemment qu'une protéine Tax mutée, ne pouvant former de corps nucléaires, était capable d'activer, comme une protéine Tax sauvage, les étapes cytoplasmiques et nucléaires de la voie NF- κ B, remettant en cause cette hypothèse (Bonnet et al., 2012).

Par ailleurs, la détection d'éléments de la machinerie de SUMOylation dans les corps nucléaires Tax, comme les protéines SUMO1 (*Small Ubiquitin-like Modifier 1*) ou l'enzyme de conjugaison Ubc9, laisse penser que ces structures correspondent à des sites de SUMOylation actifs des protéines (Kfoury et al., 2011).

Afin de coordonner ses différentes fonctions, Tax circule de façon dynamique et bidirectionnelle entre le cytoplasme et le noyau, ainsi qu'entre ses corps nucléaires (Burton et al., 2000; Kfoury et al., 2011). Il faut par ailleurs noter que la localisation de Tax dans les cellules peut être influencée par différents stimuli comme le stress génotoxique, qui favorise l'export nucléaire de la protéine (Gatza and Marriott, 2006), mais également par d'autres partenaires cellulaires, comme la déubiquitylase STAMBPL1 (*STAM-Binding Protein-Like 1*), qui entraîne l'export de Tax et est également impliquée dans sa redistribution en réponse au stress génotoxique (Lavorgna and Harhaj, 2012).

En ce qui concerne la protéine Tax2 du virus HTLV-2, sa localisation est similaire à celle de la protéine Tax1 du HTLV-1, qui vient d'être décrite, avec une distribution à la fois dans le cytoplasme, notamment au niveau du réticulum endoplasmique, et dans le noyau (Avesani et al., 2010). Il semble cependant que Tax2 ne forme pas de corps nucléaires et soit présente dans le cytoplasme de toutes les cellules, tandis que Tax1 n'est retrouvée que dans la moitié des cellules positives (Turci et al., 2009).

Outre sa localisation cytoplasmique et nucléaire, Tax peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire, grâce à son interaction avec de nombreuses protéines impliquées dans la voie de sécrétion. Ces protéines Tax sécrétées ont été notamment mises en évidence au niveau du liquide céphalorachidien de patients atteints de TSP/HAM, contribuant à l'inflammation et à la pathogenèse (Alefantis et al., 2005b; Jain et al., 2007).

La distribution diversifiée et dynamique de Tax dans les cellules est rendue possible grâce à la présence de différents domaines dans la protéine, gouvernant sa localisation au niveau de compartiments spécifiques ou son interaction avec différents partenaires cellulaires.

III.2.2. Structure de la protéine Tax

Tax est une protéine de 353 acides aminés, correspondant à un poids moléculaire de 40kDa, dont la séquence est hautement conservée entre les différents sous-types moléculaires d'HTLV-1 (Romanelli et al., 2013; Shirinian et al., 2013).

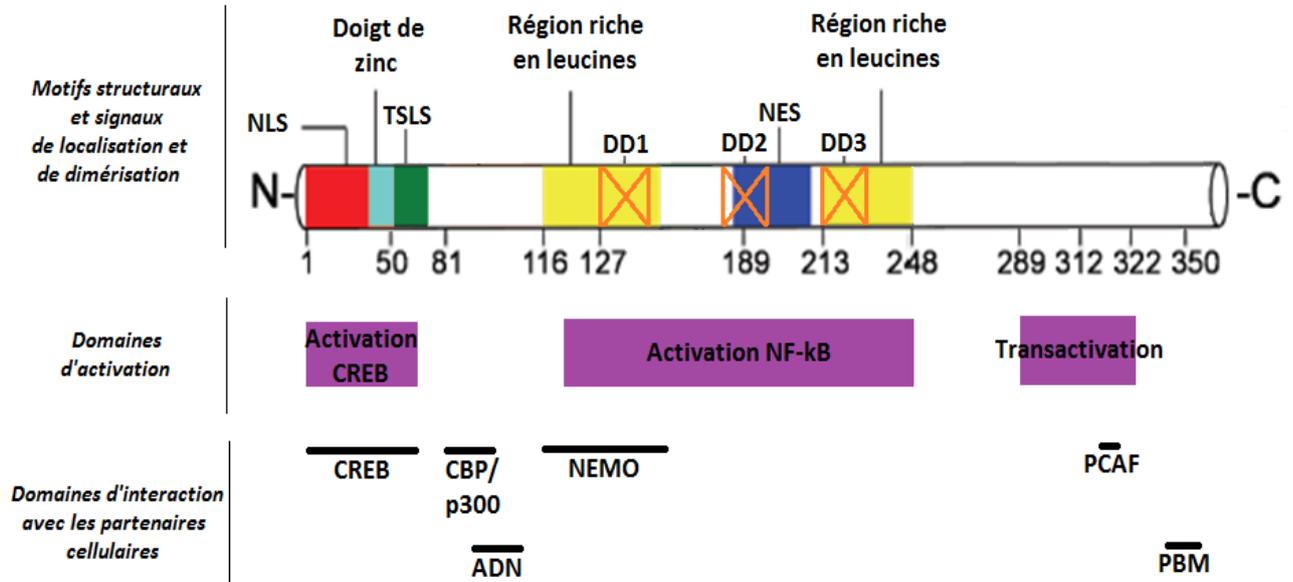


FIGURE 44 : Structure de la protéine Tax.

Représentation schématique de la séquence protéique de Tax avec ses quelques motifs structuraux (motif en doigt de zinc, régions riches en leucines), ses signaux de localisation (NLS, TSLS et NES) et ses domaines de dimérisation (DD1, DD2 et DD3). Les principaux domaines fonctionnels de la protéine virale ont également été illustrés avec les domaines d'activation CREB et NF-κB, ainsi que celui impliqué dans la transactivation, et les nombreux domaines d'interaction avec les partenaires cellulaires principaux de Tax (CREB, CBP/p300, NEMO, PCAF, les sillons d'ADN et les protéines à motif PDZ via le domaine PBM). D'après (Curren et al., 2012; Lavorgna and Harhaj, 2014).

Afin de lui permettre de circuler entre le cytoplasme et le noyau pour interagir avec ses nombreux partenaires et réaliser ses fonctions, la protéine Tax contient un signal de localisation nucléaire (NLS), situé dans les 50 premiers résidus de sa partie N-terminale, ainsi qu'un signal d'export nucléaire (NES), riche en leucines et localisé entre les acides aminés 188 à 202 (Curren et al., 2012; Gitlin et al., 1991; Smith and Greene, 1992) (**FIGURE 44**). De façon intéressante, le signal NES de Tax est masqué et ce sont les interactions avec des protéines cellulaires ou les modifications de Tax qui entraînent son exposition (Alefantis et al., 2003). Par ailleurs, une séquence appelée TSLS (*Tax Speckled structure Localization Signal*), située à côté du signal NLS, a été mise en évidence comme permettant la localisation de Tax au niveau des corps nucléaires (Fryrear et al., 2009).

La formation de dimères de Tax est un élément essentiel pour la localisation de la protéine virale mais également pour ses fonctions, notamment pour qu'elle induise la transactivation optimale des LTR (Jin and Jeang, 1997; Tie et al., 1996). Un domaine de dimérisation, découpé en trois sous-parties (DD1, DD2 et DD3), a été identifié dans la région centrale de Tax (Basbous et al., 2003; Tie et al., 1996) (**FIGURE 44**). Un motif en doigt de zinc, localisé entre les acides aminés 22 à 53, a également été impliqué dans le processus de dimérisation (Jin and Jeang, 1997; Semmes and Jeang, 1992a).

Bien que la structure tridimensionnelle de Tax n'ait pas encore été déterminée, l'analyse de sa séquence protéique ainsi que celle de différents mutants a permis la mise en évidence de multiples domaines fonctionnels dans la protéine virale (Semmes and Jeang, 1992b; Smith and Greene, 1990).

En ce qui concerne la fonction transactivatrice de Tax, sa région N-terminale, et notamment le motif en doigt de zinc, semblent nécessaires pour que Tax interagisse avec les facteurs CREB (Goren et al., 1995; Yin et al., 1995) (**FIGURE 44**). Une région, située entre les acides aminés 81 à 95 et similaire au motif KID retrouvé dans la protéine CREB, a par ailleurs été montrée comme étant requise pour l'interaction entre Tax et les co-activateurs CBP/p300 (Harrod et al., 1998). Les résidus 319 et 320 de Tax, ont pour leur part été impliqués dans la liaison aux co-activateurs PCAF (Jiang et al., 1999). Les contacts de Tax avec le petit sillon de l'ADN, permettant la stabilisation du tétramère Tax/CREB/ATF sur le LTR, sont réalisés au niveau des acides aminés 89 à 110 de la protéine virale (Kimzey and Dynan, 1998). Enfin, un domaine associé à la fonction transactivatrice de Tax a été identifié entre les résidus 289 à 322 (Semmes and Jeang, 1995).

Pour ce qui est de l'activation de la voie NF- κ B, la protéine Tax possède un important domaine, au niveau de sa partie centrale, qui est impliqué dans ce processus, avec notamment une des régions riches en leucines nécessaire pour l'interaction avec NEMO (Xiao et al., 2000) (**FIGURE 44**).

Un dernier motif, très important pour les fonctions de Tax et notamment pour sa capacité transformante, a été caractérisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ce motif, appelé PBM (*PDZ Binding Motif*), correspond aux quatre derniers acides aminés de Tax, c'est-à-dire aux résidus E/T/E/V, et est capable de se lier au domaine dit PDZ (*PSD-95/Dlg/ZO-1*), retrouvé dans de nombreuses protéines cellulaires, dont le suppresseur de tumeur Dlg ou la protéine MAGI-3, qui coopère avec PTEN pour inhiber la voie PI3K-Akt (Hirata et al., 2004; Romanelli et al., 2013; Rousset et al., 1998) (**FIGURE 44**).

Les protéines Tax1 du HTLV-1 et Tax2 du HTLV-2, qui présentent près de 85% de similarités au niveau de leurs séquences protéiques, se distinguent d'ailleurs par ce domaine PBM. En effet, contrairement à ce qui vient d'être décrit pour Tax1, la protéine Tax2 ne possède pas de motif PBM. L'absence de ce motif explique notamment le faible pouvoir transformant de Tax2, participant aux différences de pathogénèse constatées entre les virus HTLV-1 et HTLV-2 (Higuchi and Fujii, 2009; Hirata et al., 2004).

Outre sa structure, la protéine Tax est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles, qui vont moduler sa distribution et ses fonctions. En effet, ces modifications induisent des changements dans la conformation de la protéine, régulant ainsi les relations entre Tax et ses multiples partenaires cellulaires.

III.3. Les modifications post-traductionnelles de Tax déterminent sa localisation et ses fonctions

Comme la plupart des protéines cellulaires, Tax possède différentes modifications post-traductionnelles, qui participent à la régulation et à la diversité de ses fonctions. Ces modifications ont également un impact sur la localisation subcellulaire de la protéine. Par ailleurs, Tax peut altérer les modifications post-traductionnelles de protéines cellulaires cibles, comme NEMO, afin de moduler leur activité et de favoriser la réplication et la pathogénèse virale (Currer et al., 2012).

A l'heure actuelle, cinq modifications ont été décrites au niveau de la protéine Tax.

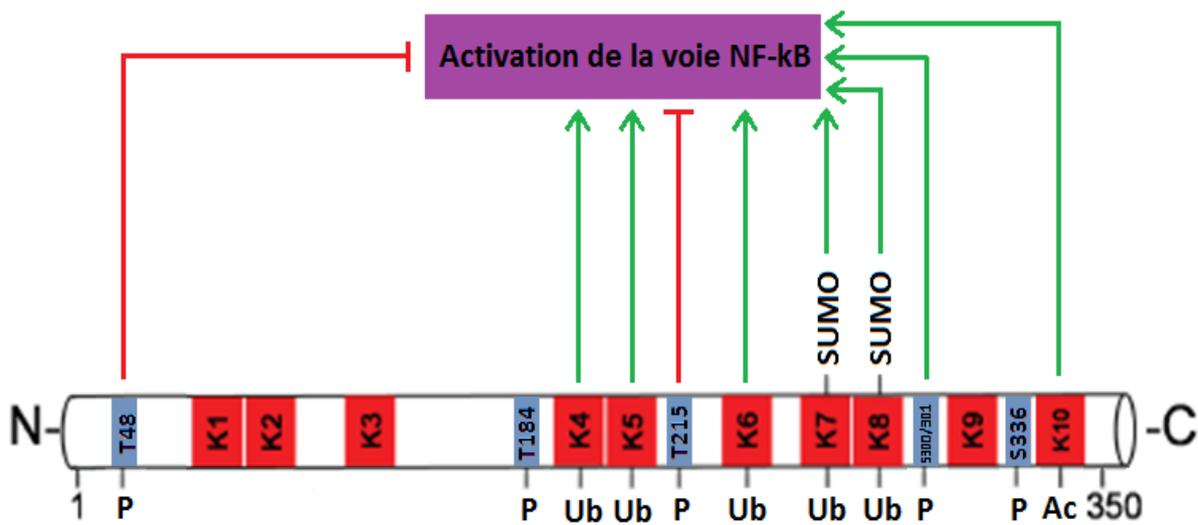


FIGURE 45 : Les modifications post-traductionnelles de Tax.

Représentation schématique de la protéine Tax et de ses différents résidus, cibles des modifications post-traductionnelles. Les acides aminés thréonines (T) et sérines (S) phosphorylés (P) sont illustrés en bleu et les 10 lysines (K), qui peuvent être ubiquitinylées (Ub), SUMOylées (SUMO) ou encore acétylées (Ac), sont indiquées en rouge. L'impact de ces modifications post-traductionnelles sur la capacité de Tax à activer la voie NF-κB est également symbolisé par des traits rouges, correspondant à l'inhibition de la voie, et par des flèches vertes correspondant à son activation. D'après (Lavorgna and Harhaj, 2014).

La première modification post-traductionnelle de Tax à avoir été identifiée est la phosphorylation (Nyunoya et al., 1988). Plusieurs résidus sont phosphorylés, modulant la distribution subcellulaire de Tax et entraînant des effets activateurs ou au contraire inhibiteurs sur ses fonctions (**FIGURE 45**). En effet, la phosphorylation des sérines 300 et/ou 301 est nécessaire pour la localisation de Tax au niveau des corps nucléaires et pour l'activation des voies CREB et NF- κ B (Bex et al., 1999). A l'inverse, la phosphorylation de la thréonine 215 inhibe l'activation des voies CREB et NF- κ B et celle de la thréonine 48 réprime uniquement la voie NF- κ B (Durkin et al., 2006). Les résidus thréonine 184 et sérine 336 phosphorylés ne semblent pas avoir d'effets sur l'activité de Tax dans la modulation de ces voies.

La ou les protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de Tax n'ont pas encore été clairement identifiées. Seule une étude réalisée *in vitro* a montré l'implication de la kinase CK2, qui phosphoryle la sérine 336 de Tax mais également des résidus non décrits, correspondant à la sérine 344 et à la thréonine 351, proches du motif PBM (Bidoia et al., 2010).

Certains des acides aminés proline de la protéine Tax peuvent par ailleurs être isomérisés. L'interaction entre Tax et l'enzyme PIN1 (*Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1*), responsable de l'isomérisation des prolines précédées d'une sérine ou d'une thréonine phosphorylées, ainsi que la surexpression de cette enzyme dans les cellules de patients ATLL, suggèrent que PIN1 participe à ce processus (Jeong et al., 2009; Peloponese et al., 2009). Bien que l'implication de cette enzyme n'ait pas directement été démontrée, des études ont prouvé que PIN1 augmentait la demi-vie de Tax en empêchant son ubiquitinylation et sa dégradation via le protéasome cellulaire, mais également qu'elle favorisait l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax en facilitant son interaction avec NEMO (Jeong et al., 2009; Peloponese et al., 2009).

Hormis les acides aminés sérines, thréonines et prolines, les résidus lysines de Tax sont les cibles principales de trois modifications post-traductionnelles, essentielles dans les fonctions de la protéine virale, et notamment dans l'activation de la voie NF- κ B. En effet, sur les 10 lysines que compte la séquence protéique de Tax, 7 peuvent être acétylées, ubiquitinylées ou SUMOylées. Les lysines 7 (K7) et 8 (K8) sont même les cibles à la fois de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation (**FIGURE 45**).

L'acétylation concerne la dixième et dernière lysine de Tax (K10), en position 346 et est réalisée par l'histone acétyltransférase p300, un partenaire cellulaire de Tax (**FIGURE 45**).

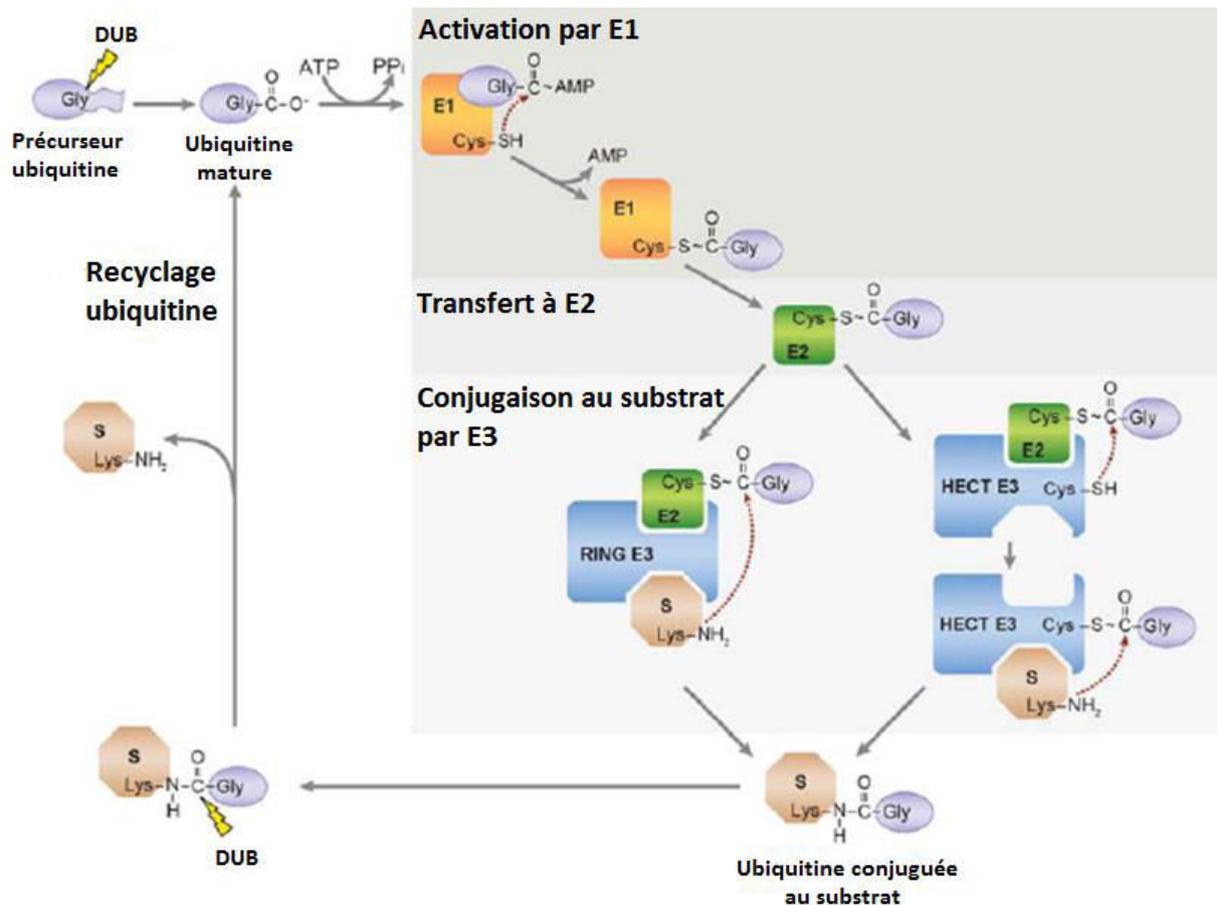


FIGURE 46 : Le processus d'ubiquitylation des protéines.

Représentation schématique du cycle de conjugaison des protéines ubiquitines (Ub) à leur protéine substrat. Le précurseur ubiquitine est tout d'abord mûré par clivage de son extrémité C-terminale par une déubiquitynase (DUB). L'ubiquitine mûre suit ensuite trois grandes étapes conduisant à sa fixation au substrat. Elle passe par une première étape d'activation, réalisée par l'enzyme E1, correspondant à l'adénylation de son extrémité C-terminale à partir de l'ATP. La protéine Ub est ensuite conjuguée à la cystéine du site catalytique actif d'E1 avant de passer par une deuxième étape, qui est son transfert au niveau de la cystéine de l'enzyme de conjugaison E2. Enfin, l'ubiquitine est conjuguée au substrat grâce à une enzyme E3 ubiquitine ligase, à domaine RING ou à domaine HECT. La protéine Ub peut finalement être recyclée en étant clivée de son substrat par une déubiquitynase. D'après (Kerscher et al., 2006).

La phosphorylation des sérines 300 et 301 de Tax ainsi que la formation des corps nucléaires sont requises pour l'acétylation de la protéine virale, qui conduit à l'activation de l'expression de gènes cibles NF- κ B (Lodewick et al., 2009). Une étude a en outre démontré une colocalisation entre p300 et la protéine Tax acétylée au niveau des corps nucléaires, suggérant que ces structures sont des sites actifs pour l'acétylation de Tax (Lodewick et al., 2011).

Les lysines de Tax peuvent par ailleurs être conjuguées à de petites protéines, correspondant aux ubiquitines (Ub) et aux SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*). Ces modifications jouent un rôle clé dans la localisation subcellulaire de Tax ainsi que dans ses fonctions, et plus particulièrement dans le processus d'activation de la voie NF- κ B.

III.3.1. L'ubiquitylation de Tax

a) Description du processus d'ubiquitylation des protéines

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés et de 8kDa, identifiée dans le milieu des années 1970 et qui est présente, de façon très conservée, chez différentes espèces, allant de la levure à l'homme. Par la suite, de nombreuses autres petites protéines, aux propriétés similaires à celles de l'ubiquitine, ont été découvertes et ont été qualifiées d'Ubl (*Ubiquitin-like proteins*) (Kerscher et al., 2006). Les Ubl régulent de nombreux processus biologiques comme la transcription, la réparation de l'ADN ou encore la transduction de signal (Kerscher et al., 2006). Bien que ces protéines Ubl n'aient pas une similarité de séquence importante avec l'ubiquitine, elles possèdent toutes une structure tridimensionnelle commune, appelée conformation en β -grasp (Hochstrasser, 2000) (**FIGURE 47A**). Les ubiquitines, comme les Ubl, sont également capables d'être conjuguées de façon covalente au niveau de résidus lysines d'autres protéines, grâce à un mécanisme commun.

Les précurseurs ubiquitines subissent une maturation réalisée par des déubiquitylases (DUB), permettant d'exposer, à leur extrémité C-terminale, le motif di-glycine nécessaire à leur conjugaison (Kerscher et al., 2006; Komander and Rape, 2012) (**FIGURE 46**).

Une fois matures, les ubiquitines passent par trois étapes successives pour aboutir finalement à leur fixation aux protéines substrats (Komander, 2009) (**FIGURE 46**).

La première étape correspond à l'activation de l'ubiquitine par l'adénylation de son extrémité C-terminale. Cette réaction est catalysée par une enzyme appelée enzyme d'activation E1, à partir de l'ATP (*Adénosine Tri-Phosphate*). L'ubiquitine est ensuite transférée au niveau de la cystéine du site catalytique de l'enzyme E1, formant une liaison thioester riche en énergie.

La protéine Ub est ensuite transférée au niveau de la cystéine d'une deuxième enzyme, qualifiée d'enzyme de conjugaison E2.

Enfin, l'ubiquitine est conjuguée à la protéine substrat grâce à une troisième et dernière enzyme, l'ubiquitine ligase E3. Il faut noter qu'il existe deux types d'enzymes E3 ligases : les E3 à domaine RING (*Really Interesting New Gene*) et les E3 à domaine HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) (Metzger et al., 2012) (**FIGURE 46**). Les ubiquitine ligases à domaine RING interagissent à la fois avec l'enzyme E2 et la protéine substrat, afin de les rapprocher et de positionner correctement le substrat pour faciliter le transfert de l'ubiquitine. Au contraire, les ubiquitine ligases à domaine HECT se lient à la protéine Ub grâce à la cystéine de leur site actif, puis elles la transfèrent au substrat.

L'ubiquitinylation est un processus transitoire et réversible via l'intervention de déubiquitinylnases, qui clivent la protéine Ub du substrat (**FIGURE 46**). L'ubiquitine est alors recyclée et peut être de nouveau conjuguée à un autre substrat. Il existe près de 100 enzymes déubiquitinylnases chez l'homme, regroupées en cinq familles distinctes, partageant toutes un domaine de liaison aux chaînes d'ubiquitine, leur permettant ainsi de se lier aux protéines cibles (Komander et al., 2009; Reyes-Turcu et al., 2009).

Chez les eucaryotes, deux enzymes E1 ont été mises en évidence, ainsi que près de 40 enzymes E2 et plus de 600 enzymes E3. La spécificité de reconnaissance des protéines substrats est déterminée par le couple E2/E3 (Komander and Rape, 2012). La conjugaison de l'ubiquitine à la protéine substrat correspond à la formation d'une liaison isopeptidique entre le groupe carboxyle de la glycine C-terminale de la protéine Ub et le groupement ϵ amine d'une lysine du substrat (**FIGURE 46**). Bien que les lysines restent les résidus privilégiés pour l'ubiquitinylation, de plus en plus de sites alternatifs sont découverts. Ainsi, des études ont décrit la conjugaison d'ubiquitine au niveau de groupements amines de méthionines N-terminales de protéines cibles, même si cette liaison reste rare (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Tooley and Schaner Tooley, 2014). Plus récemment, l'ubiquitinylation de plusieurs substrats sur des résidus cystéines, sérines ou encore thréonines par estérification a également été démontrée (Wang et al., 2012).

Différents types d'ubiquitinylation peuvent avoir lieu au niveau des protéines substrats (**FIGURE 47B**). Des monoubiquitinylnations, qui correspondent à la liaison d'une ubiquitine sur une lysine cible du substrat, ou des multi-monoubiquitinylnations lorsque ce sont plusieurs lysines du substrat qui sont conjuguées en même temps à une seule protéine Ub.

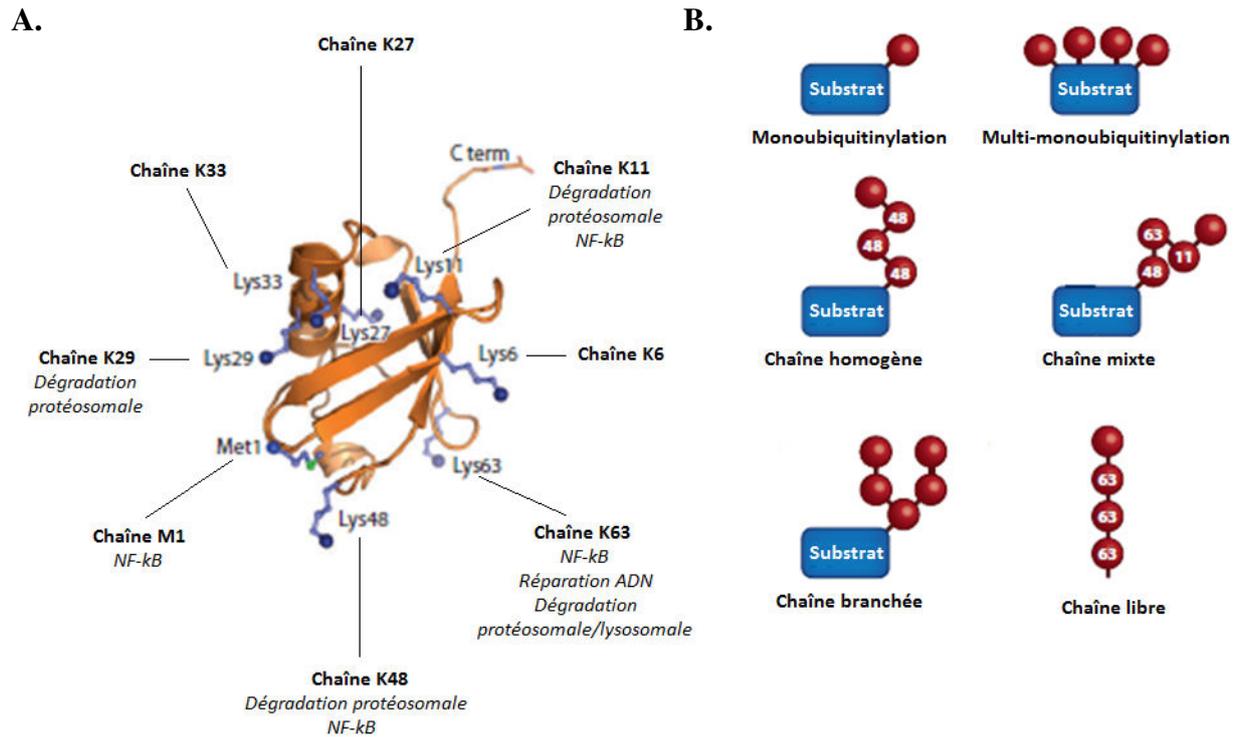


FIGURE 47 : Représentations de l'ubiquitine et des différentes ubiquitylations possibles du substrat.

- A.** Structure tridimensionnelle commune des ubiquitines et des Ubl, appelée conformation en β -grasp. Les sept lysines présentes dans ces protéines sont indiquées, ainsi que les principaux rôles des chaînes constituées à partir de chacun de ces résidus. La méthionine 1 (M1) à l'extrémité N-terminale de l'ubiquitine peut également être conjuguée à d'autres protéines Ub.
- B.** Représentation schématique de l'ensemble des ubiquitylations qui peuvent avoir lieu au niveau des protéines substrats, que ce soit des mono ou des polyubiquitylations, à l'origine de chaînes d'Ub. D'après (Komander and Rape, 2012).

Ce sont plus fréquemment des polyubiquitinations qui sont effectuées, avec une seule ou plusieurs sortes de liaisons entre les ubiquitines, formant ainsi des chaînes à la surface des substrats (Komander and Rape, 2012) (**FIGURE 47B**).

La protéine ubiquitine contient sept lysines (K6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63) qui peuvent toutes servir à la conjugaison d'autres ubiquitines, à l'origine de la constitution de chaînes de longueur et de structure variées (Adhikari and Chen, 2009) (**FIGURE 47A**). De façon intéressante, ces sept lysines ainsi que la méthionine M1 à l'extrémité N-terminale de l'ubiquitine, qui est également capable d'être conjuguée à des protéines Ub, sont réparties sur l'ensemble de la protéine et pointent dans plusieurs directions, favorisant des orientations distinctes pour les différentes chaînes en fonction de leur type de liaison.

Il existe plusieurs types de chaînes d'ubiquitine : les chaînes homogènes, qui sont des enchaînements de protéines Ub, toujours liées par les mêmes lysines, des chaînes mixtes, dans lesquelles les ubiquitines sont associées par différentes liaisons, des chaînes branchées, qui correspondent à la conjugaison de plusieurs lysines d'une même ubiquitine à d'autres protéines Ub, et enfin des chaînes libres d'ubiquitine liées en K63, qui ne sont associées à aucun substrat (Adhikari and Chen, 2009) (**FIGURE 47B**).

Les chaînes liées en K48 sont les plus abondantes dans les cellules et servent de signal pour la dégradation des protéines via le protéasome 26S. Des études montrent toutefois que ces chaînes pourraient également avoir une fonction non protéolytique (Trempe, 2011).

L'autre chaîne d'ubiquitine importante au niveau cellulaire est la chaîne liée en K63, qui généralement n'entraîne pas la dégradation des protéines mais module leurs interactions et leurs activités. Ces chaînes K63 sont impliquées dans la régulation de l'activation de kinases ou encore dans celle de voies de signalisation dont la voie NF- κ B (Chen and Sun, 2009; Skaug et al., 2009). Les chaînes d'ubiquitine linéaires, correspondant à la liaison de protéines Ub au niveau de leur extrémité M1, qui sont mises en place par le complexe E3 ligase LUBAC (*Linear Ubiquitin chain Assembly Complex*) constitué des protéines HOIL-1L, HOIP et SHARPIN, ont également un rôle dans l'activation de la voie NF- κ B (Tokunaga, 2013).

b) L'ubiquitinylation de Tax et son implication dans l'activation de la voie NF- κ B

L'ubiquitinylation de la protéine Tax est une modification très importante pour réguler sa stabilité, sa localisation ainsi que l'activation de la voie NF- κ B, notamment celle de la voie canonique, indispensable à la persistance virale (Lavorgna and Harhaj, 2014).

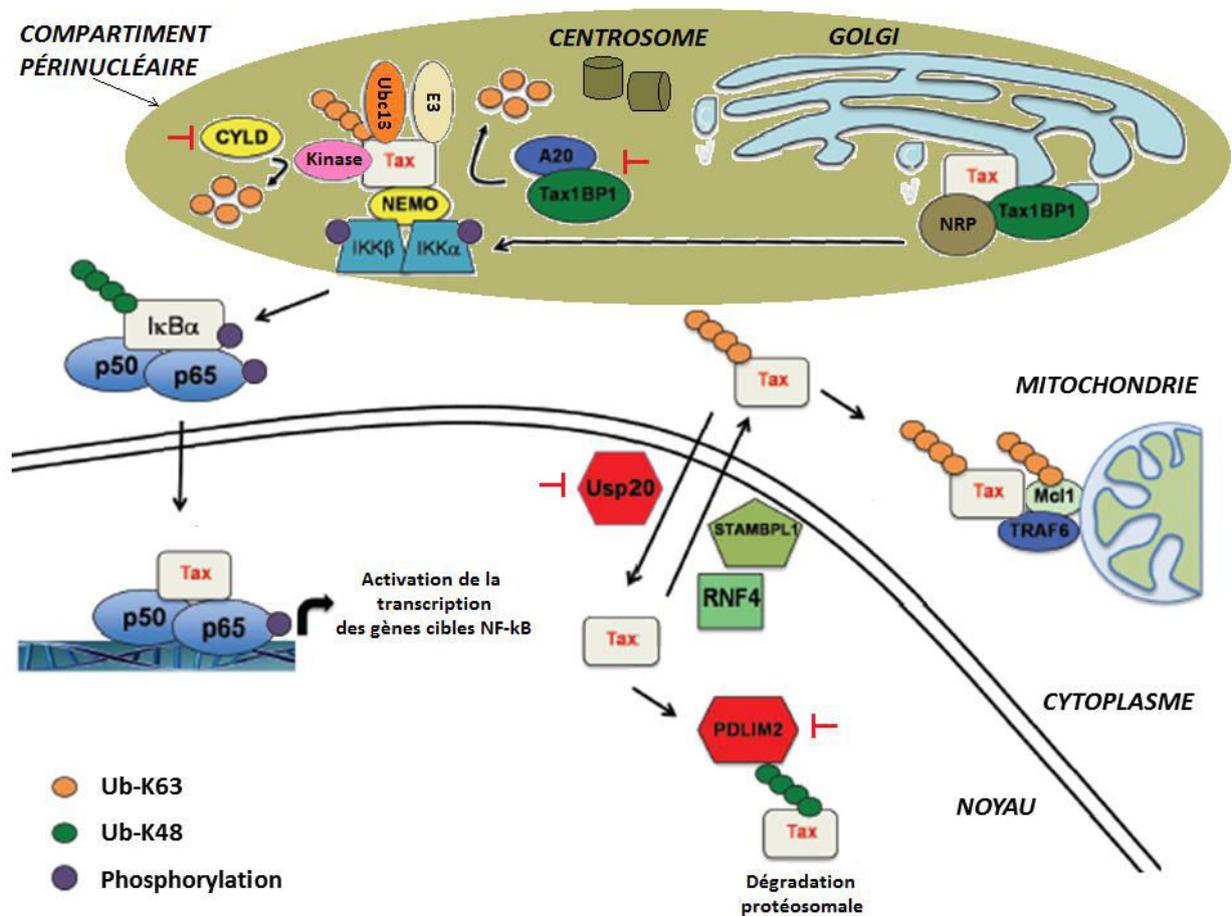


FIGURE 48 : Rôle de l'ubiquitinylation de Tax dans sa localisation et dans l'activation de la voie NF-κB.

Représentation schématique des différents mécanismes impliquant l'ubiquitinylation de la protéine Tax (avec des protéines ubiquitines formant des chaînes liées en K63 (Ub-K63) ou en K48 (Ub-K48)), dans la localisation de la protéine virale, ainsi que dans le processus d'activation constitutive de la voie NF-κB. L'ubiquitinylation K63 de Tax est essentielle pour la localisation de la protéine virale au niveau du compartiment périnucléaire, où elle recrute NEMO, favorisant ainsi l'arrivée des sous-unités catalytiques IKKα et β. Ces chaînes K63 de Tax forment de véritables plateformes, permettant le recrutement d'autres protéines nécessaires à l'activation du complexe IKK, dont des kinases comme TAK1. Le complexe NRP/TAX1BP1 favorise également l'ubiquitinylation de Tax au niveau du compartiment périnucléaire, participant à l'activation NF-κB. Plusieurs déubiquitinyloses contribuent au contrôle négatif de l'activation de la voie NF-κB par Tax (CYLD, USP20, le complexe A20) ainsi que des ubiquitine ligases comme PDLIM2. Ces protéines sont inactivées dans les cellules infectées par HTLV-1, par l'action directe ou non de Tax (cette inactivation est symbolisée par les « T » rouges). Au contraire, la déubiquitinylose STAMBPL1, probablement associée à l'E3 ligase RNF4, favorise l'export nucléaire de Tax et donc l'activation NF-κB. Le rôle de ces différents acteurs est expliqué en détail dans le texte. D'après (Lavorgna and Harhaj, 2014).

Il a rapidement été montré que Tax pouvait recruter directement les sous-unités protéosomales HsN3 et HC9, afin de favoriser la maturation du précurseur NF- κ B p105 (Béraud and Greene, 1996; Rousset et al., 1996). Des études menées par notre laboratoire ainsi que par une autre équipe ont par la suite décrit que la protéine virale était mono et polyubiquitinylée, ce qui n'entraînaient pas sa dégradation, mais régulaient sa liaison au protéasome ainsi que ses fonctions (Chiari et al., 2004; Peloponese et al., 2004). La monoubiquitinylation de Tax, induite lors de dommages à l'ADN, a par ailleurs été impliquée dans l'export de la protéine du noyau vers le cytoplasme (Gatza et al., 2007). Récemment, il a également été prouvé que la conjugaison de Tax aux ubiquitines favorisait son passage dans les corps nucléaires, ainsi que le recrutement de NEMO au niveau de ces structures (Kfoury et al., 2011).

La génération par notre laboratoire d'une série de mutants de lysines de Tax a permis d'identifier les résidus cibles de l'ubiquitinylation dans la protéine virale, correspondant aux lysines 4 à 8 (Chiari et al., 2004; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006) (**FIGURE 45**). Il semble par ailleurs que ce sont majoritairement des chaînes d'ubiquitine liées en K63 qui sont retrouvées sur la protéine virale, entraînant sa localisation dans le compartiment périnucléaire, associé à l'appareil de Golgi et au centrosome (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Shembade et al., 2007) (**FIGURE 48**).

Cette ubiquitinylation K63 de Tax est essentielle à l'activation de la voie NF- κ B, au niveau du compartiment périnucléaire. En effet, ces chaînes constituent de véritables « plateformes », favorisant le recrutement au sein de ce compartiment des différents acteurs de la voie NF- κ B dont la protéine NEMO, qui constitue l'élément clé du complexe IKK, permettant ensuite de recruter les sous-unités catalytiques IKK α et β au niveau de Tax (Harhaj and Sun, 1999; Kfoury et al., 2008; Shembade et al., 2007) (**FIGURE 48**). La protéine NEMO possède en effet un domaine de liaison aux ubiquitines en C-terminal, mais également deux domaines leucines-zipper à chaque extrémités, lui permettant d'interagir directement avec Tax, via sa région riche en leucines (Xiao et al., 2000). La fixation de NEMO au niveau des ubiquitines de Tax ne semble donc pas indispensable au recrutement de cette sous-unité régulatrice pour induire l'activation NF- κ B. Il a d'ailleurs été montré que dans des cellules déficientes en NEMO l'expression de protéines mutées, incapables de se lier aux chaînes d'ubiquitine, rétablit cependant l'activation de la voie NF- κ B par Tax (Wu and Sun, 2007).

Ces chaînes K63 de Tax sont toutefois importantes pour le recrutement et l'activation de protéines kinases, impliquées dans la phosphorylation des sous-unités IKK α et β , comme la kinase TAK1 et sa sous-unité régulatrice TAB2 (Wu and Sun, 2007; Yu et al., 2008).

La protéine Tax ubiquitinylée joue donc un rôle analogue à celui de RIP1, dans le cas de l'activation de la voie NF- κ B par le TNF (Chen, 2012).

L'enzyme E2 de conjugaison requise pour l'ubiquitinylation K63 de Tax a été identifiée comme étant l'enzyme Ubc13 (Shembade et al., 2007) (**FIGURE 48**).

En revanche, l'identité de l'E3 ligase participant à cette modification post-traductionnelle reste encore inconnue. Plusieurs candidates potentielles ont été étudiées, notamment les protéines de la famille des TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*), dont TRAF2, 5 et 6 (Yu et al., 2008). D'autres données ont montré que l'ubiquitine ligase RNF4 pouvait interagir avec Tax et augmenter son ubiquitinylation, à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'activation de la voie NF- κ B (Fryrear et al., 2012). Toutefois, une étude récente démontre que l'interaction entre Tax et RNF4 serait plutôt impliquée dans la diminution de la stabilité de l'E3 ligase, lors de réponses à des dommages dans l'ADN (Guo et al., 2014). Aucune de ces candidates n'a pour le moment été confirmée, maintenant donc les interrogations autour de l'ubiquitine ligase de Tax.

D'autre part, une autre protéine appelée Optineurin ou NRP (*NEMO-Related Protein*) a été décrite comme favorisant l'ubiquitinylation de Tax (Journo et al., 2009b). En effet, Tax peut interagir avec NRP et NEMO, pour former un complexe localisé au niveau du compartiment périnucléaire (**FIGURE 48**). La protéine TAX1BP1 est également recrutée par NRP, pour augmenter la polyubiquitinylation de Tax, favorisant ainsi l'activation de la voie NF- κ B. Par ailleurs, la liaison entre Tax et NRP nécessite la présence des lysines cibles de l'ubiquitinylation dans la protéine virale, ainsi que le domaine de fixation aux ubiquitines de la protéine NRP.

L'ubiquitinylation de Tax est régulée par plusieurs déubiquitinylasses, participant ainsi au contrôle de l'activation de la voie NF- κ B (**FIGURE 48**).

Récemment, l'interaction entre Tax et la déubiquitinyllase CYLD a été mise en évidence, réduisant sa conjugaison aux protéines Ub et affectant par conséquent la liaison Tax/NEMO (Wu et al., 2011). Dans les cellules infectées par HTLV-1, l'enzyme CYLD est phosphorylée par le complexe IKK, ce qui l'inhibe et favorise l'activation continue de la voie NF- κ B (Reiley et al., 2005; Wu et al., 2011).

La déubiquitinyllase USP20 est également capable de diminuer l'ubiquitinylation de Tax, son expression étant d'ailleurs réprimée dans les cellules transformées par HTLV-1 (Yasunaga et al., 2011).

Une autre déubiquitylase importante pour le contrôle de l'activation NF- κ B est l'enzyme A20 (Harhaj and Dixit, 2012). Pour réaliser sa fonction, cette enzyme s'associe à la protéine TAX1BP1 ainsi qu'aux E3 ligases RNF11 et Itch, pour constituer le complexe A20 (Shembade et al., 2008, 2009) (**FIGURE 48**). Tax est capable de se lier à TAX1BP1 mais également de bloquer sa phosphorylation par IKK α , empêchant ainsi la formation du complexe A20 (Shembade et al., 2008, 2011). Dernièrement, il a été montré que le recrutement de TAX1BP1 par Tax passait par la protéine CADM1 (*Cell Adhesion Molecule 1*), qui favorise l'ubiquitylation K63 de la protéine virale via le recrutement d'Ubc13 (Pujari et al., 2015). Le complexe A20 induit, en outre, la dégradation de cette enzyme E2 Ubc13. De nouveau, Tax peut contrer cet effet en interagissant avec Ubc13 et préserver ainsi les complexes Ubc13/E3 ligases responsables de son ubiquitylation (Shembade et al., 2010).

L'ubiquityne ligase PDLIM2 est également impliquée dans la régulation négative de la voie NF- κ B, en induisant la conjugaison de Tax à des ubiquitynes K48, entraînant sa relocalisation au niveau du noyau où elle est alors dégradée par le protéasome (Yan et al., 2009a) (**FIGURE 48**). Toutefois, dans les cellules transformées par HTLV-1, l'expression de cette E3 ligase est réprimée, principalement par méthylation de l'ADN et ce, de façon indépendante de Tax (Yan et al., 2009b).

Récemment, la déubiquitylase STAMBPL1 (*STAM-Binding Protein Like 1*) a été identifiée comme régulant la localisation de la protéine virale, en diminuant sa conjugaison aux chaînes K48, favorisant son export nucléaire (Lavorgna and Harhaj, 2012). Ce mécanisme contribue indirectement au maintien de l'activation de la voie NF- κ B. L'implication de l'ubiquityne ligase RNF4 dans l'export nucléaire de Tax, via son ubiquitylation, suggère une possible coopération entre STAMBPL1 et RNF4 (Fryrear et al., 2012).

La protéine Tax favorise par ailleurs l'ubiquitylation de différents partenaires cellulaires, participant à leur activation ou au contraire à leur dégradation (**FIGURE 48**). Tax interagit notamment avec le suppresseur de tumeur FOXO4 et avec l'ubiquityne ligase MDM2, induisant l'ubiquitylation K48 et la dégradation protéosomale de FOXO4 (Oteiza and Mechti, 2011).

Une étude récente a prouvé que Tax induisait l'ubiquitylation de 136 protéines, dont 22 sont impliquées dans l'activation du complexe IKK. La protéine anti-apoptotique MCL1 a entre autre été mise en évidence. Il a ainsi été décrit que l'expression de Tax provoque l'ubiquitylation K63 de MCL1, via l'E3 ligase TRAF6 (Choi and Harhaj, 2014b).



FIGURE 49 : Comparaison de séquences entre les protéines SUMO et ubiquitine.

Alignement des séquences protéiques des quatre SUMO (SUMO-1, 2, 3 et 4), appartenant à la famille des Ubl, avec celle de l'ubiquitine. Les résidus conservés entre ces séquences sont illustrés en bleu, avec notamment le motif di-glycine en C-terminal, essentiel à la conjugaison de ces protéines. Les acides aminés situés après ce motif seront clivés lors de l'étape de maturation des précurseurs, par des protéases spécifiques (DUB pour l'ubiquitine ou SENP pour les SUMO). Les changements conservatifs et semi-conservatifs sont indiqués en violet et en jaune respectivement. Les trois résidus différents entre les séquences des protéines SUMO-2 et 3 sont soulignés en vert et indiqués par des flèches. Enfin, le motif consensus de SUMOylation, permettant la formation de chaînes de SUMO et dans lequel se trouve la lysine K11 cible de la SUMOylation, est encadré en rouge. Ce motif est commun aux SUMO-2, 3 et 4 alors qu'il est absent de SUMO-1. D'après (Wilkinson and Henley, 2010).

La protéine Tax peut en effet se lier à TRAF6, grâce à un motif identifié à côté de son domaine PBM, l'activer puis induire sa redistribution au niveau des mitochondries, où l'E3 ligase ubiquitinylyle MCL1, pour la stabiliser et empêcher sa dégradation en réponse à un stress génotoxique (**FIGURE 48**).

Tax est donc capable de détourner la machinerie d'ubiquitylation cellulaire, afin de favoriser l'activation constitutive de la voie NF- κ B, notamment au niveau de la voie canonique, contribuant à la persistance virale ainsi qu'à la prolifération des cellules infectées par HTLV-1. De façon intéressante, aucune ubiquitylation endogène significative n'a été détectée au niveau de la protéine Tax2 du virus HTLV-2, alors qu'elle peut parfaitement activer la voie NF- κ B canonique (Journo et al., 2013). Ceci suggère donc que les mécanismes moléculaires d'activation de la voie canonique par Tax1 et Tax2 sont différents.

La SUMOylation est l'autre modification post-traductionnelle prépondérante dans la distribution subcellulaire de Tax ainsi que dans ses fonctions, dont l'activation NF- κ B.

III.3.2. La SUMOylation de Tax

a) Description du processus de SUMOylation des protéines

Les protéines SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) appartiennent à la famille des Ubl, avec une conformation en β -grasp caractéristique. Elles ne partagent toutefois que 20% de similarité avec la séquence protéique de l'ubiquitine (van der Veen and Ploegh, 2012; Vertegaal, 2011) (**FIGURE 49**). Les SUMO ont un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, comme la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, ou encore l'organisation du cytosquelette et l'autophagie (Sarangi and Zhao, 2015; Wasik and Filipek, 2014). Leur dérégulation est fréquente dans différentes pathologies, dont les cancers (Bettermann et al., 2012; Sarge and Park-Sarge, 2009).

Quatre protéines SUMO paralogues ont été décrites chez l'homme : SUMO-1, 2, 3 et 4 (**FIGURE 49**). La protéine SUMO-1, de 11kDa, a été la première à avoir été identifiée. Les protéines SUMO-2 et SUMO-3, qui ont des séquences très proches ne différant que de trois acides aminés, sont considérées comme équivalentes et désignées sous le terme de SUMO-2/3. En revanche, leurs séquences ne présentent que 50% de similarité avec celle de SUMO-1. Les protéines SUMO-2/3 se distinguent notamment par la présence d'un motif consensus de SUMOylation, absent dans SUMO-1 (Wilkinson and Henley, 2010) (**FIGURE 49**).

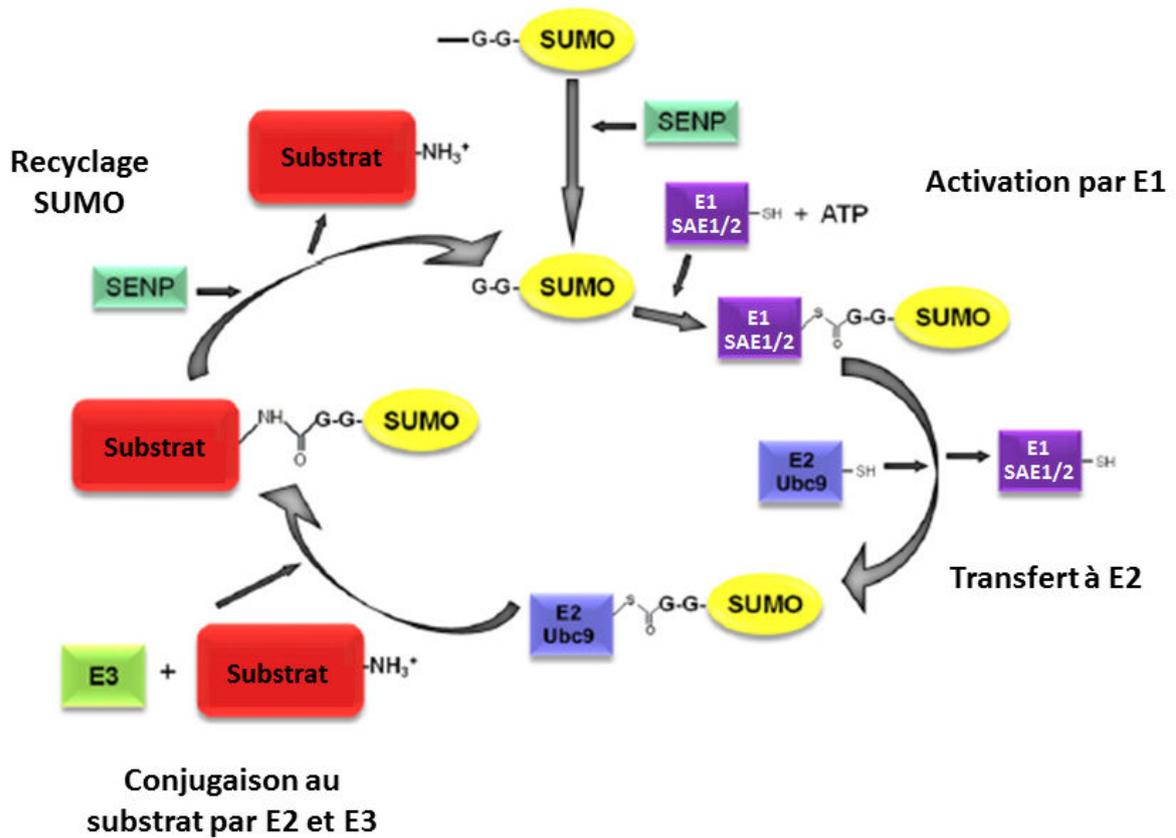


FIGURE 50 : Le processus de SUMOylation des protéines.

Représentation schématique du cycle de conjugaison des protéines SUMO à leur substrat. Le précurseur SUMO est tout d'abord mûré par clivage de son extrémité C-terminale par une protéase de la famille SENP. Comme pour le mécanisme d'ubiquitinylation, la protéine SUMO mature suit ensuite plusieurs grandes étapes conduisant à sa fixation au substrat. Elle passe par une première étape d'activation, réalisée par l'enzyme E1 SAE1/2. La protéine SUMO est alors conjuguée à la cystéine du site catalytique actif d'E1, avant de passer par une deuxième étape, qui est son transfert au niveau de la cystéine du domaine UBC de l'enzyme E2 de conjugaison Ubc9. Enfin, SUMO est conjuguée au substrat grâce à Ubc9 et à une enzyme E3 SUMO ligase, au mode d'action similaire à celui des E3 ubiquitine ligases à domaine RING. La protéine SUMO peut finalement être recyclée en étant clivée de son substrat par une protéase SENP. D'après (Wasik and Filipek, 2014).

En effet, comme pour le processus d'ubiquitylation, les protéines SUMO sont conjuguées sur les substrats au niveau de résidus lysines. Ces acides aminés doivent cependant se situer dans un environnement particulier pour être SUMOylés, correspondant au motif consensus de SUMOylation ΨKxE . Les protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 possèdent plusieurs lysines dans leur séquence, mais seules SUMO-2/3 ont un site consensus autour de leur lysine 11, leur permettant de former des chaînes, contrairement à la protéine SUMO-1. Cette protéine SUMO-1 se retrouve donc généralement à l'extrémité des chaînes de SUMO-2/3 pour les terminer. La SUMOylation reste toutefois possible sur des lysines localisées en dehors de motifs consensus. Une autre différence majeure entre SUMO-1 et SUMO-2/3 réside dans leur disponibilité cellulaire. Alors que SUMO-2/3 est présente sous forme libre dans le nucléoplasme des cellules, SUMO-1 se retrouve principalement sous forme conjuguée à des substrats qui sont localisés au niveau de l'enveloppe nucléaire, du nucléole ou encore dans le cytoplasme. Ainsi, lors d'un stress cellulaire par exemple, la SUMOylation des protéines est augmentée mais essentiellement avec des SUMO-2/3, qui sont plus facilement disponibles (Wilkinson and Henley, 2010).

La protéine SUMO-4 est le dernier paralogue à avoir été mis en évidence (**FIGURE 49**). Elle présente près de 87% de similarité de séquence avec SUMO-2. Son expression et sa conjugaison aux substrats restent cependant mal connues, tout comme sa fonction.

Le processus de SUMOylation des protéines se rapproche fortement de celui d'ubiquitylation décrit précédemment (**FIGURE 50**).

En effet, le précurseur SUMO doit tout d'abord être clivé par une protéase spécifique, appartenant à la famille des SENP (*Sentrin/SUMO-specific Protease*). Ce clivage permet d'exposer le motif di-glycine situé à l'extrémité C-terminale des protéines SUMO, nécessaire à leur conjugaison.

Les SUMO matures sont ensuite prises en charge par l'enzyme d'activation E1, où elles se lient à la cystéine du site catalytique, avant d'être transférées à la cystéine du domaine actif UBC (*UBiquitin-Conjugating domain*) de l'enzyme de conjugaison E2 (Wasik and Filipek, 2014; van Wijk and Timmers, 2010) (**FIGURE 50**).

Contrairement à la grande diversité existante parmi les enzymes de la machinerie d'ubiquitylation, une seule E1, l'hétérodimère SAE1/SAE2, et une unique E2, l'enzyme Ubc9, ont été mises en évidence dans le mécanisme de SUMOylation des protéines (Kerscher et al., 2006). L'intervention d'enzymes E3 SUMO ligases dans le processus a longtemps été sujet à débat, du fait de la capacité d'Ubc9 à lier directement les substrats *in vitro*.

Ces dernières années, de nombreuses protéines avec des activités SUMO ligases ont cependant été identifiées, comme la famille des PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) ou la protéine RanBP2 (Wasik and Filipek, 2014). Ces E3 ligases fonctionnent suivant le modèle des ubiquitine ligases à domaine RING, en rapprochant Ubc9 et le substrat, sans se lier aux SUMO (**FIGURE 50**). Elles jouent un rôle central dans la régulation de la SUMOylation, puisqu'elles augmentent l'efficacité du processus et déterminent la spécificité du substrat à modifier.

Le processus de SUMOylation, comme l'ubiquitinylation, est contrôlé par les protéases SENP, qui peuvent cliver les SUMO des protéines cibles, afin de les recycler dans de nouvelles conjugaisons (**FIGURE 50**).

De façon intéressante, SUMO-1 et SUMO-2/3 ne partagent que 15% de substrats en commun, signe qu'elles sont impliquées dans des fonctions bien distinctes. Les enzymes E3, qui déterminent les substrats à modifier, peuvent participer à cette spécificité de conjugaison à SUMO-1 ou à SUMO-2/3. D'autre part, certaines SENP clivent préférentiellement l'une ou l'autre des protéines SUMO, favorisant donc leur conjugaison sur de nouvelles cibles. Enfin, la présence de motifs SIM (*SUMO-Interacting Motif*), au niveau des substrats, reconnus spécifiquement par SUMO-1 ou SUMO-2/3, peut également contribuer à cette spécificité (Hecker et al., 2006).

La SUMOylation est par ailleurs impliquée dans la régulation de l'activation de la voie NF- κ B (Lee and Miyamoto, 2011). En effet, trois protéines des voies canonique et non canonique ont pour l'heure été mises en évidence comme pouvant être conjuguées à des SUMO, principalement des SUMO-1, ce qui perturbe leur fonction et donc l'ensemble de la voie de signalisation.

La première protéine identifiée est l'inhibiteur I κ B α , qui est la cible de SUMO-1 et de SUMO-2/3, entraînant des effets opposés. Lorsqu'il est conjugué à SUMO-1, celle-ci se fixe au niveau de sa lysine 21, qui est aussi le résidu sur lequel sont conjuguées les chaînes d'ubiquitine K48 à l'origine de sa dégradation. La fixation des protéines SUMO-1 sur I κ B α inhibe donc son élimination par le protéasome, bloquant par conséquent l'activation de la voie NF- κ B canonique (Desterro et al., 1998). L'inhibiteur I κ B α est également conjugué à des SUMO-2/3, en réponse à une stimulation au TNF α notamment, favorisant son ubiquitinylation et sa dégradation protéosomale, entraînant l'activation NF- κ B (Aillet et al., 2012).

Une autre protéine, la protéine NEMO, au rôle central dans la voie NF- κ B canonique, est ciblée par la SUMOylation en cas de stress génotoxique (McCool and Miyamoto, 2012).

Lors de lésions dans l'ADN, l'E2 Ubc9 avec l'E3 ligase PIASy induisent la conjugaison de SUMO-1 sur NEMO, très probablement dans le noyau. Cette SUMOylation entraîne la phosphorylation de NEMO par la kinase ATM, préalablement activée par la présence de cassures double brin dans l'ADN, puis sa monoubiquitinylation. NEMO est alors exportée dans le cytoplasme où elle recrute les sous-unités catalytiques IKK α et β , qui sont activées par ATM. La kinase TAK1 peut également participer à cette activation du complexe IKK. La SUMOylation et l'ubiquitinylation de NEMO, qui ciblent les mêmes lysines, coopèrent donc pour activer la voie NF- κ B. Ce mécanisme est par ailleurs régulé négativement par la protéase SENP2, qui clive les SUMO de NEMO.

Au niveau de la voie NF- κ B non canonique, le facteur p100 a également été décrit comme étant conjugué à des protéines SUMO-1, favorisant sa phosphorylation et donc au final, l'activation de la voie (Vatsyayan et al., 2008).

La présence de sites potentiels de SUMOylation au niveau de nombreuses autres protéines de la voie NF- κ B confirme l'importance de cette modification post-traductionnelle dans le contrôle de l'activation de cette voie, ciblée préférentiellement par Tax.

b) La SUMOylation de Tax et son implication dans l'activation de la voie NF- κ B

La protéine Tax a été décrite comme pouvant être conjuguée à des SUMO-1 ainsi qu'à des chaînes de SUMO-2/3, *in vitro* dans des cellules adhérentes transfectées (Journo et al., 2013; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). Ce sont les lysines 7 (K7) et 8 (K8) de Tax, déjà impliquées dans son ubiquitinylation, qui sont les principales cibles de la SUMOylation (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006) (**FIGURE 45**).

La conjugaison de Tax aux SUMO a été associée à sa localisation au niveau des corps nucléaires. En effet, différentes études ont montré la colocalisation de la protéine virale dans ces structures avec des protéines SUMO-1 surexprimées ou endogènes, ainsi qu'avec des protéines SUMO-3 surexprimées (Kfoury et al., 2011; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). L'absence de corps nucléaires dans des cellules exprimant des mutants de lysines de Tax, étant peu ou pas SUMOylés, suggère un rôle de la SUMOylation de Tax dans la formation de ces corps (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). Toutefois, la détection d'éléments de la machinerie de SUMOylation, comme l'enzyme E2 Ubc9 ou encore des protéines SUMO-1, au sein des corps nucléaires Tax, laisse penser que ces structures seraient plutôt des sites actifs pour la conjugaison de SUMO aux protéines (Kfoury et al., 2011).

Le rôle de la SUMOylation de Tax dans sa capacité à activer la voie NF- κ B est sujet à controverse. Les premières études, menées notamment par notre laboratoire, ont montré que des mutants de Tax, dans lesquels les lysines cibles des protéines SUMO étaient mutées, pouvaient de nouveau activer la transcription dépendante de NF- κ B lorsqu'ils étaient fusionnés à des protéines SUMO (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). Par ailleurs, la présence de protéines Tax SUMOylées associées à des composants de la voie NF- κ B, comme RelA ou NEMO, au niveau des corps nucléaires, renforçait l'hypothèse de la nécessité de la SUMOylation de la protéine virale dans l'activation optimale de la transcription, à partir de promoteurs à éléments de réponse κ B (Bex et al., 1997; Kfoury et al., 2011).

Cependant, des analyses récentes réalisées par notre équipe ont prouvé qu'un mutant de Tax (Tax-P79AQ81A), parfaitement ubiquitinylé mais peu SUMOylé, était capable d'activer la transcription de gènes cibles de la voie NF- κ B, avec la même efficacité qu'une protéine Tax sauvage (Bonnet et al., 2012). L'importance de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B a donc été remise en cause, nécessitant de nouvelles recherches, afin d'aborder cette problématique sous un angle différent en mettant au point des outils plus adaptés que les mutants de Tax.

IV. LE RÔLE DES MACHINERIES DE SUMOYLATION ET D'UBIQUITINYLATION DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B : NOUVELLES PROBLÉMATIQUES

Comme cela vient d'être décrit au cours de la partie précédente, l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax est un événement clé dans le pouvoir oncogène de cette protéine virale, puisqu'elle est impliquée dans les dérèglements d'importants processus biologiques au sein des cellules infectées par HTLV-1, comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation des dommages à l'ADN. De nombreuses études ont ainsi montré que l'activation de cette voie de signalisation par Tax entraînait l'immortalisation et la transformation des cellules (Robek and Ratner, 1999; Yamaoka et al., 1996). L'emploi d'inhibiteurs spécifiques de NF- κ B, comme Bay 11-7082, ACHP, 9AA ou encore DHMEQ, responsables de l'apoptose de lignées de lymphocytes T infectés par HTLV-1 ou de cellules leucémiques ATLL, confirme l'importance de cette voie dans la survie des cellules infectées, et par conséquent dans la persistance virale (Ju et al., 2014; Mori et al., 2002; Ohsugi et al., 2007; Sanda et al., 2006).

Les modifications post-traductionnelles de Tax, et plus particulièrement son ubiquitinylation, jouent un rôle critique dans sa capacité à recruter les différents acteurs de la voie NF- κ B, dont les éléments du complexe IKK, pour activer ensuite l'ensemble de la voie (Kfoury et al., 2012; Lavorgna and Harhaj, 2014). Toutefois, l'enzyme E3 ligase impliquée dans la conjugaison de Tax aux chaînes d'ubiquitine K63 notamment, reste encore inconnue, ne permettant pas le décryptage précis des mécanismes conduisant au recrutement et à l'activation des éléments du complexe IKK au niveau de la protéine virale.

D'autre part, le rôle de la SUMOylation de Tax dans l'activation NF- κ B reste sujet à débat, suite aux récentes données publiées par notre laboratoire, et demande d'être précisé par de nouvelles recherches.

Au cours de mon doctorat, je me suis donc attachée à analyser ces deux axes d'étude, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes participant à l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax et de déterminer l'implication exacte de la SUMOylation et de l'ubiquitinylation de la protéine virale dans ce processus.

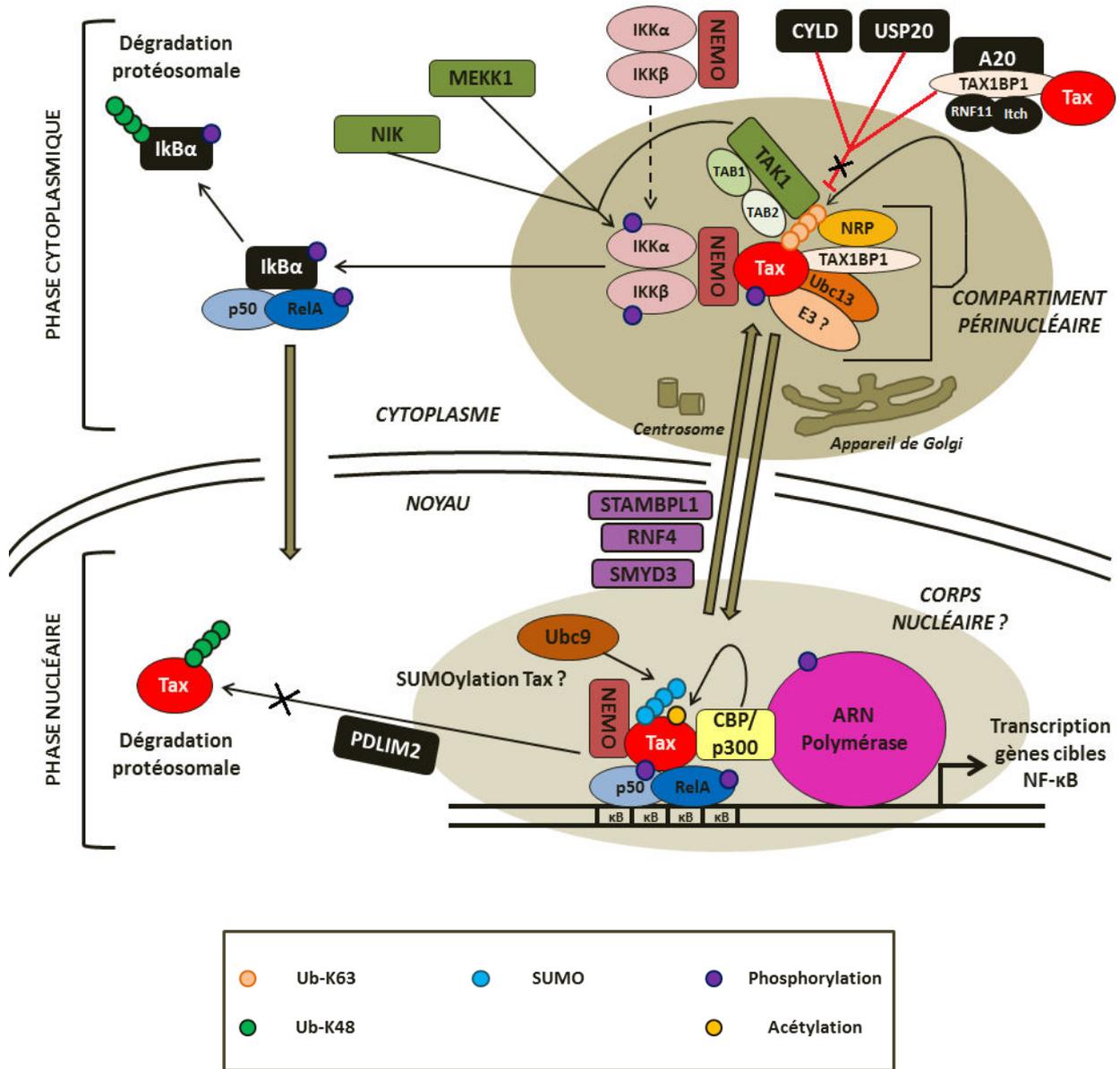


FIGURE 51 : Modèle d'activation de la voie NF- κ B canonique induite par Tax.

Représentation schématique de l'activation de la voie NF- κ B par Tax qui est composée de deux étapes : l'une cytoplasmique dans laquelle l'ubiquitinylation de Tax est nécessaire au recrutement et à l'activation du complexe IKK au niveau du compartiment périnucléaire, et l'autre nucléaire où Tax favorise l'activation optimale des promoteurs à éléments de réponse κ B. L'implication de la SUMOylation et des corps nucléaires dans cette étape est sujet à controverse. Le rôle précis des mécanismes représentés dans ce modèle est expliqué en détail dans le texte. Les protéines inhibitrices de la voie NF- κ B sont symbolisées en noir. Les croix noires représentent l'inactivation de ces protéines dans les cellules infectées par HTLV-1, par l'action directe ou non de Tax. Les facteurs cellulaires favorisant l'export nucléaire de la protéine virale sont en violet et les potentielles kinases recrutées par Tax pour phosphoryler le complexe IKK en vert. Enfin, les éléments toujours en questionnement dans ce modèle d'activation sont indiqués par des points d'interrogations.

IV.1. Modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B induite par la protéine Tax

Les recherches menées par différentes équipes, dont notre laboratoire, ont permis d'établir un modèle d'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax, composé de deux étapes : une première étape cytoplasmique dans laquelle l'ubiquitinylation de Tax est nécessaire au recrutement et à l'activation du complexe IKK au niveau du compartiment périnucléaire, et une deuxième étape nucléaire pour laquelle la SUMOylation de Tax favoriserait l'activation optimale de la transcription des gènes cibles NF- κ B (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006) (**FIGURE 51**). L'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax, associées chacune à une de ces étapes, ont longtemps été considérées comme étant toutes les deux indispensables à une parfaite et complète activation de la voie NF- κ B.

Cependant, une récente étude réalisée par notre laboratoire a remis en cause l'implication de la conjugaison de Tax aux protéines SUMO, dans l'étape nucléaire de l'activation. Jusqu'à présent, il avait été décrit que la SUMOylation de Tax permettait à la protéine virale d'interagir directement avec les dimères p50/RelA, afin de favoriser leur fixation au niveau des promoteurs cibles à éléments de réponse κ B (Pepin et al., 1994; Shembade and Harhaj, 2010; Suzuki et al., 1994). Ce mécanisme était supposé se dérouler au sein de corps nucléaires spécifiques, dans lesquels Tax recrute différentes molécules, dont les co-activateurs CBP/p300, la protéine NEMO ou encore l'ARN polymérase sous forme phosphorylée, nécessaire à la transcription (Bex et al., 1997) (**FIGURE 51**).

Dans notre étude, nous avons prouvé qu'un mutant de Tax (Tax-P79AQ81A), parfaitement ubiquitinylé mais SUMOylé à seulement 20%, ne forme pas de corps nucléaires et est tout à fait capable d'activer la transcription dépendante de NF- κ B, comme une protéine Tax sauvage complètement SUMOylée (Bonnet et al., 2012) (**ANNEXE 2**). Ces données suggèrent donc que la SUMOylation de Tax, comme la formation des corps nucléaires, ne seraient pas nécessaires à l'activation de la voie NF- κ B par la protéine virale. En revanche, nos analyses confirment le rôle essentiel de l'ubiquitinylation de Tax dans l'étape cytoplasmique de l'activation.

La présence d'éléments de la machinerie de SUMOylation, comme l'enzyme E2 de conjugaison Ubc9, au niveau de ces corps nucléaires laisse penser que ces structures seraient toutefois des sites actifs de conjugaison des protéines aux SUMO. Des protéines NEMO SUMOylées ont d'ailleurs été retrouvées dans ces corps (Kfoury et al., 2011) (**FIGURE 51**).

D'autre part, la présence des histones acétylases CBP/p300 dans ces structures spécifiques de Tax suggère que ce sont également des sites actifs d'acétylation des protéines, où Tax pourrait potentiellement être acétylée, ce qui constitue un événement important pour qu'elle active de façon optimale la voie NF- κ B (Lodewick et al., 2009).

En outre, Tax peut être recrutée dans le nucléoplasme où elle est conjuguée à des chaînes d'ubiquitine K48 par l'enzyme E3 ligase PDLIM2, afin d'être dégradée par le protéasome, ce qui inhibe l'activation NF- κ B (Yan et al., 2009a). Ce mécanisme reste cependant rare dans les cellules infectées par HTLV-1, en raison de la répression de l'expression de PDLIM2 (Yan et al., 2009b).

Au niveau de l'étape cytoplasmique, la conjugaison de Tax à des chaînes d'ubiquitine K63 est indispensable pour qu'elle interagisse avec NEMO et recrute les sous-unités catalytiques IKK α et β au niveau de compartiments périnucléaires, associés à l'appareil de Golgi et au centrosome (Harhaj et al., 2006; Huang et al., 2009; Kfoury et al., 2008; Shembade et al., 2007) (**FIGURE 51**). En favorisant la transphosphorylation d'IKK α et β ou en recrutant des kinases, comme TAK1, MEKK1 ou encore NIK, Tax active constitutivement le complexe IKK, conduisant à la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B α puis à son ubiquitinylation K48 et enfin, à sa dégradation protéosomale (Geleziunas et al., 1998; Lavorgna and Harhaj, 2014; Uhlik et al., 1998; Wu and Sun, 2007; Yin et al., 1998). Le dimère p50/RelA peut alors être transloqué dans le noyau pour aller se fixer sur ses promoteurs cibles.

Dans le cytoplasme, l'activation de la voie NF- κ B par Tax est inhibée par des déubiquitinylnases, comme USP20 ou le complexe A20. La protéine virale est toutefois capable de bloquer leurs actions, en réprimant l'expression d'USP20 ou en se liant à l'un des composants du complexe A20, la protéine TAX1BP1, empêchant ainsi sa formation (Shembade et al., 2008). Tax bloque également la dégradation d'Ubc13 par le complexe A20, qui est l'enzyme E2 de conjugaison impliquée dans son ubiquitinylation, notamment avec des chaînes K63 (Shembade et al., 2007, 2010) (**FIGURE 51**). Pour l'instant, l'identité de l'enzyme E3 ligase, associée à Ubc13 pour induire l'ubiquitinylation de Tax, n'est pas encore connue et reste un élément clé du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B à déterminer.

Outre son ubiquitinylation, la phosphorylation de Tax au niveau de ses résidus sérines en position 300 et 301 semble être nécessaire à l'activation optimale de NF- κ B car cette modification est pré-requise pour que la protéine virale soit ubiquitinylée, mais également pour qu'elle migre dans le noyau (Avesani et al., 2010; Bex et al., 1999).

Il faut noter que l'ensemble de ce processus d'activation est dynamique et repose sur le passage bidirectionnel de Tax entre le cytoplasme et le noyau, au niveau des pores nucléaires, sans nécessité de transporteurs, comme l'exportine CRM1, ou d'énergie (Kfoury et al., 2011; Tsuji et al., 2007) (**FIGURE 51**).

De nombreux partenaires cellulaires ont par ailleurs été mis en évidence comme modulant les modifications post-traductionnelles et la localisation de la protéine virale, influençant ainsi l'activation de la voie NF- κ B (**FIGURE 51**).

L'histone méthyltransférase SMYD3 ou encore l'ubiquitine ligase SUMO-dépendante RNF4 ont notamment été décrites comme participant à l'activation NF- κ B, en favorisant l'export nucléaire de Tax (Fryrear et al., 2012; Yamamoto et al., 2011). D'autre part, la déubiquitinyase STAMBPL1 entraîne également l'export de la protéine virale dans le cytoplasme, en diminuant sa conjugaison aux chaînes d'ubiquitine K48 induite par PDLIM2, augmentant ainsi l'activation de la voie NF- κ B (Lavorgna and Harhaj, 2012). Enfin, la protéine NRP contribue à l'étape cytoplasmique de l'activation de la voie par Tax en favorisant, avec TAX1BP1, son ubiquitinylation au niveau du compartiment périnucléaire (Journo et al., 2009b).

IV.2. Problématiques abordées

Au laboratoire, nous nous intéressons au rôle des modifications post-traductionnelles de Tax, et plus particulièrement de sa SUMOylation et de son ubiquitinylation, dans l'activation constitutive de la voie NF- κ B, qui est encore source de nombreuses interrogations.

En effet, l'un des points majeurs de discussion concerne l'implication de la SUMOylation de Tax dans l'étape nucléaire de l'activation NF- κ B, qui est sujet à controverse depuis la publication de notre étude (Bonnet et al., 2012).

L'autre point de questionnement important se rapporte à l'association de Tax au complexe NEMO/IKK α /IKK β , pour laquelle l'ubiquitinylation de Tax est essentielle. Le mécanisme d'assemblage de ce complexe au niveau du compartiment périnucléaire reste flou, tout comme l'identité de l'enzyme E3 ligase impliquée dans la conjugaison de Tax aux ubiquitines, notamment liées en K63, qui est l'élément clé dans le recrutement du complexe IKK.

Pendant mon doctorat, j'ai donc développé de nouvelles approches permettant d'analyser plus précisément ces deux axes de recherche, dans le but de préciser le modèle d'activation de la voie NF- κ B induite par Tax qui a été présenté précédemment.

IV.2.1. Rôle de la SUMOylation de Tax dans l'étape nucléaire de l'activation de la voie NF- κ B

Dans notre étude (Bonnet et al., 2012), nous remettons en cause l'importance de la SUMOylation de la protéine Tax dans le cadre de l'activation transcriptionnelle de la voie NF- κ B. Ces données, contraires au modèle établi jusqu'alors de l'activation NF- κ B, ont été obtenues grâce à une protéine mutée de Tax (Tax-P79AQ81A), ubiquitinylée comme une protéine sauvage mais faiblement SUMOylée. L'emploi de ce nouveau mutant a permis d'étudier distinctement les effets de la SUMOylation et de l'ubiquitinylation de Tax, contrairement aux mutants de lysines qui étaient utilisés dans les études précédentes et dans lesquels des résidus cibles de ces deux modifications post-traductionnelles étaient mutés dans la protéine virale (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). En outre, notre étude a montré que la fusion du mutant Tax-P79AQ81A à des protéines SUMO stabilisait cette protéine dans le cytoplasme et augmentait par ailleurs son ubiquitinylation, notamment avec des chaînes K63. La restauration de l'activation NF- κ B constatée avec les mutants de lysines, fusionnés à des SUMO, pourrait donc s'expliquer par ces mécanismes (Bonnet et al., 2012).

Nos résultats suscitérent une controverse puisque d'autres équipes affirmèrent que le faible niveau de SUMOylation du mutant Tax-P79AQ81A (environ 20%) était suffisant pour induire l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B (Shirinian et al., 2013; Turci et al., 2012; Zane and Jeang, 2012).

Nous avons donc décidé de réexaminer complètement l'importance de cette modification post-traductionnelle de la protéine Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, en élaborant une nouvelle stratégie basée, non plus sur l'utilisation de mutants de Tax, mais sur l'inhibition directe de la machinerie de SUMOylation endogène dans les cellules. Grâce à cette technique, nous avons été capables d'étudier spécifiquement l'impact de la SUMOylation des protéines Tax sur l'activation de la voie NF- κ B, sans modifications de leur séquence.

IV.2.2. Décryptage du mécanisme de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax via l'identification de son ubiquitine ligase

L'ubiquitinylation de Tax, notamment avec des chaînes K63, a été montrée comme étant indispensable à son association au complexe NEMO/IKK α /IKK β , dans le compartiment périnucléaire (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Shibata et al., 2011).

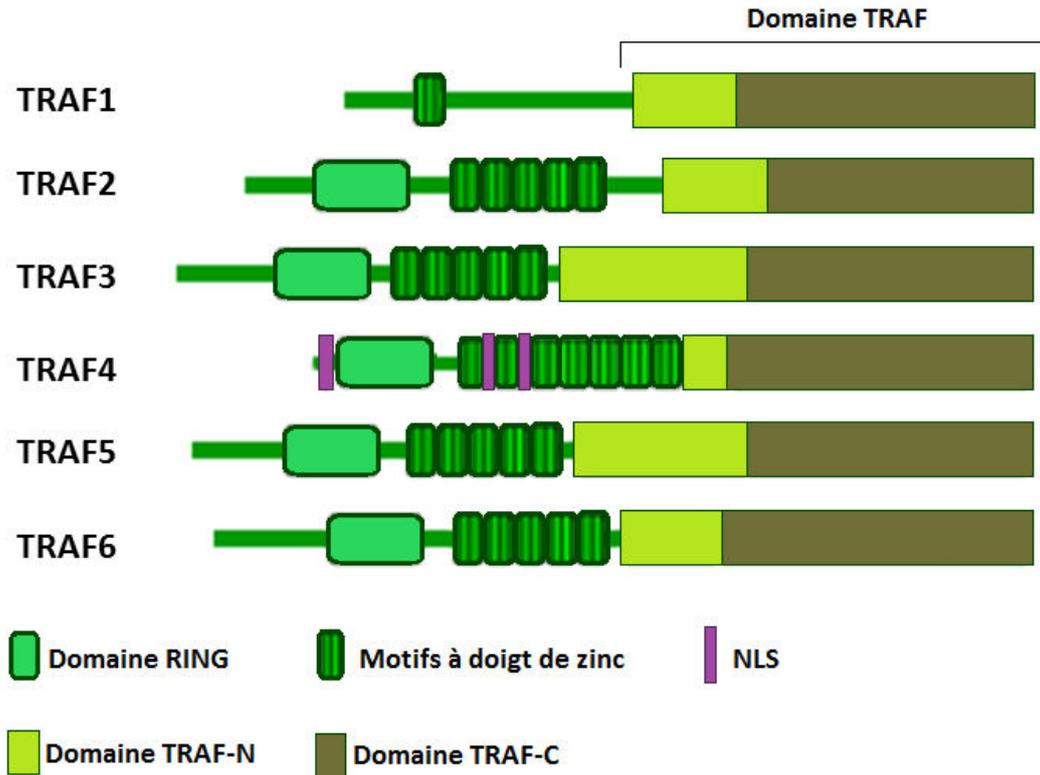


FIGURE 52 : Structure des protéines TRAF.

Représentation schématique des six membres connus et bien caractérisés de la famille des TRAF (TRAF1, 2, 3, 4, 5 et 6). Ces protéines possèdent toutes un domaine spécifique en C-terminal appelé TRAF, qui est composé d'une région TRAF-N, correspondant à une hélice super-enroulée, et d'une région TRAF-C, très conservée. Les protéines TRAF2 à 6 contiennent également un domaine RING et des motifs à doigt de zinc (5 à 7) en N-terminal, nécessaires à leur activité ubiquitine ligase. D'après (Xie, 2013).

Le mécanisme précis de ce recrutement et de l'activation des différents éléments du complexe IKK par la protéine virale reste toutefois mal connu. Alors que l'enzyme de conjugaison Ubc13 impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax a été identifiée, l'ubiquitine ligase associée à cette enzyme E2 n'a pas encore été déterminée. Sa découverte permettrait de mieux comprendre le mécanisme séquentiel d'assemblage du complexe Tax/NEMO/IKK α /IKK β .

Plusieurs E3 ligases potentielles ont été étudiées (Hayakawa, 2012), notamment l'enzyme RNF4. Bien que cette ubiquitine ligase puisse interagir avec Tax et augmenter son ubiquitinylation, son rôle en tant qu'E3 ligase de la protéine virale reste incertain. En effet, RNF4 est plutôt connue pour être associée à l'E2 UbcH5, et non avec Ubc13 (Plechanovová et al., 2012). Par ailleurs, RNF4 est une ubiquitine ligase SUMO-dépendante. Or, les résultats obtenus par plusieurs équipes, dont notre laboratoire, indiquent que la conjugaison de Tax aux ubiquitines est indépendante de sa SUMOylation car des mutants de lysines, comme Tax-K7-8R, ou le mutant Tax-P79AQ81A, qui ne sont pas ou peu SUMOylés, sont ubiquitinylés au même niveau que la protéine sauvage (Bonnet et al., 2012; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). L'implication de RNF4 dans l'ubiquitinylation de Tax semble donc restreinte à certains contextes particuliers, comme par exemple en cas de stress génotoxique (Fryrear et al., 2012).

Les protéines de la famille des TRAF semblent être des candidates intéressantes en tant qu'E3 ligases de Tax, auxquelles nous nous sommes intéressés au laboratoire (Lavorgna and Harhaj, 2014). Les TRAF ont été identifiées au départ comme des protéines adaptatrices, capables de se lier aux régions cytoplasmiques des récepteurs au TNF, afin de participer à la transduction du signal lors de la fixation des cytokines au niveau de leur récepteur (Ha et al., 2009; Inoue et al., 2000).

La famille des TRAF est composée de six membres bien connus, correspondant aux protéines TRAF1, 2, 3, 4, 5 et 6, qui sont caractérisées par la présence, à leur extrémité C-terminale, d'un domaine TRAF constitué d'une région TRAF-N, identifiée comme une hélice super-enroulée, et d'une région TRAF-C, très conservée (Xie, 2013) (**FIGURE 52**). Un septième membre potentiel, dont les fonctions sont peu connues, a également été mis en évidence, mais son appartenance à cette famille reste controversée en raison de l'absence de domaine TRAF-C dans cette protéine (Xu et al., 2004; Zotti et al., 2012). Le domaine TRAF permet l'homo ou l'hétérodimérisation des protéines TRAF1 à 6, ainsi que leur interaction avec de nombreux partenaires cellulaires. Les TRAF sont par ailleurs impliquées dans l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont la voie NF- κ B, suite à une stimulation par le TNF notamment, grâce à leur rôle de protéines adaptatrices (Chung et al., 2002; Xie, 2013).

Ces molécules ont également une fonction d'ubiquitine ligase, via leur domaine RING et leurs motifs à doigt de zinc, situés en N-terminal, qui sont retrouvés dans de nombreuses enzymes E3 ligases et sont nécessaires à leur fonction (Au and Yeh, 2007; Xie, 2013) (**FIGURE 52**). Seule TRAF1, qui ne possède qu'un motif à doigt de zinc sans domaine RING, est dépourvue de cette fonction. En ubiquitylant des protéines effectrices impliquées dans différentes voies de signalisation, les TRAF induisent l'activation de ces voies et participent à la transduction du signal. Ainsi, plusieurs études ont démontré l'implication de ces protéines TRAF dans l'ubiquitylation d'effecteurs participant à l'activation de la voie NF- κ B, dans le cas de stimulations cytokiniques (Bradley and Pober, 2001; Tada et al., 2001). De plus, l'association entre des TRAF et l'enzyme E2 Ubc13 pour former des chaînes d'ubiquitine K63 sur des protéines cibles a également été décrite (Lamothe et al., 2007). Enfin, de façon intéressante, une étude a suggéré que certaines TRAF augmentaient l'ubiquitylation de Tax lorsqu'elles étaient surexprimées (Yu et al., 2008).

Au laboratoire, nous avons étudié les protéines TRAF1 et TRAF2 et nous avons montré qu'elles avaient plutôt un effet inhibiteur sur l'ubiquitylation de Tax, en agissant de façon synergique lorsqu'elles étaient surexprimées (résultats non publiés). En revanche, la surexpression de TRAF5 semblait augmenter la conjugaison de Tax aux ubiquitines, ainsi que l'activation de la transcription à partir de promoteurs à éléments de réponse κ B (résultats non publiés).

Par ailleurs, la protéine TRAF5 a été décrite comme étant impliquée dans l'activation du complexe IKK induite par l'oncoprotéine LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*) du virus EBV (Devergne et al., 1998; Kraus et al., 2009).

Ces différentes données, nous ont donc poussé à étudier le rôle de TRAF5 dans l'ubiquitylation de Tax ainsi que dans la formation du complexe Tax/NEMO/IKK α /IKK β , indispensable à l'activation de la voie NF- κ B, afin de déterminer le mécanisme précis conduisant au recrutement du complexe IKK par la protéine virale.



*Matériel et
Méthodes*



I. MATÉRIEL

Au laboratoire, nous travaillons exclusivement avec des cellules humaines et notamment avec des lignées cellulaires, qui correspondent à des cellules provenant de donneurs spécifiques, qui ont été mises en culture et ont acquis la capacité de proliférer indéfiniment *in vitro*. La culture cellulaire s'est véritablement développée en 1951, grâce au biologiste George Gey qui réussit à maintenir en culture et à faire proliférer des cellules issues d'un carcinome du col de l'utérus d'une patiente, désormais illustre, nommée Henrietta Lacks (Skloot, 2010). Ces cellules, baptisées HeLa, devinrent les premières cellules humaines immortelles cultivées en laboratoire. Elles furent envoyées dans les Instituts de recherche du monde entier, permettant de grandes avancées scientifiques et médicales (études sur les gènes responsables du cancer ou encore des maladies sexuellement transmissibles, mises au point de médicaments contre la leucémie, la grippe, la maladie de Parkinson,...). Elles restent encore aujourd'hui la lignée cellulaire la plus utilisée dans les laboratoires, comme par exemple au sein de notre équipe. Au-delà des cellules, nous utilisons couramment des plasmides codant pour les protéines étudiées au laboratoire comme la protéine Tax, mais également des anticorps nous permettant d'isoler ou de détecter ces protéines d'intérêt.

L'ensemble de ces matériaux biologiques constituent la base de nos études et nous ont permis de mettre en évidence les mécanismes présentés dans les travaux de ce manuscrit.

I.1. Cellules

Au cours de nos recherches, nous avons réalisé nos expériences dans différents types cellulaires, couramment utilisés au laboratoire et tous cultivés dans une atmosphère à 5% de CO₂ et à une température de 37°C.

La lignée de cellules adhérentes HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*) fut notre matériel de base pour effectuer nos travaux. Ces cellules sont des variants de la lignée HEK 293, qui fut générée en 1973 par transformation de cellules de rein embryonnaire humain avec des fragments d'ADN d'adénovirus humains de type 5 (Graham et al., 1977). Les HEK 293T, contrairement aux cellules d'origine, possèdent l'antigène grand T du virus SV40 (*Simian Virus 40*) qui permet une suractivation du promoteur du cytomégalovirus (CMV), souvent présent dans les vecteurs d'expression utilisés pour transfecter ces cellules. La lignée de cellules adhérentes HeLa fut également employée dans nos expériences. Ces deux types cellulaires, HEK 293T et HeLa, sont cultivés en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest), 2mM de glutamine (Life Technologies), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Life Technologies).

En parallèle, nous avons utilisé une lignée de cellules HEK 293T contenant une séquence indicatrice, correspondant à cinq éléments de réponse κB, intégrée de façon stable dans leur chromatine. Ces cellules, baptisées HEK 293T NF-κB stable, ont été générées au laboratoire par transfection du plasmide pGL4.32 (décrit ci-dessous) puis sélection avec l'antibiotique hygromycine. Les HEK 293T NF-κB stable sont cultivées dans le même milieu que les lignées HEK 293T ou HeLa, additionné de 200µg/mL d'hygromycine.

Lors de nos études, la lignée de cellules T CD4⁺ MOLT4, fournie par l'équipe du Dr. Kathryn S. Jones (Frederick National Laboratory for Cancer Research, USA), fut également employée. Elles proviennent d'un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique (Minowada et al., 1972). Ce sont donc des cellules leucémiques non infectées par le virus HTLV-1. Ces lymphocytes T sont cultivés en RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institut*, Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio), 2mM de glutamine (Life Technologies), 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine (Life Technologies) et 0.5% de glucose (Life Technologies).

I.2. Plasmides et siARN

De nombreux plasmides ont été utilisés pour exprimer nos protéines d'intérêt, notamment la protéine Tax du virus HTLV-1, associées ou non à différentes étiquettes favorisant leur détection dans les cellules.

La construction codant pour la protéine Tax sauvage ainsi que celle codant pour Tax fusionnée à une étiquette 6-Histidines à son extrémité C-terminale (Tax-6His) sont clonées dans le vecteur d'expression eucaryote pSG5m. Les constructions codant pour les protéines mutées Tax-M22 (T130A/L131S) et Tax-M47 (L319S/L320S), fusionnées à une étiquette 6-Histidines (Tax-M22-6His et Tax-M47-6His), sont également clonées dans le plasmide pSG5m. Ces mutants ont été décrits dans (Chiari et al., 2004; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Smith and Greene, 1990). La construction HA-Ub sauvage nous a été donnée par le Dr. Pierre Jalinet (UMR 5239, Lyon) (Vitte et al., 2006). Les plasmides HA-SUMO-3 et His-SUMO-3 nous ont été fournis par le Dr. Valérie Lallemand-Breitenbach (Inserm, UMR 944, Paris).

Les constructions codant pour la protéine Ubc9 mutée fusionnée à une étiquette T7 (T7-Ubc9-C93S), nous ont été données par le Dr. Sébastien Nisole (Inserm, UMR-S 747, Paris). Cette enzyme T7-Ubc9-C93S est mutée au niveau de son domaine conservé UBC (*UBiquitin-Conjugating domain*) dans lequel une cystéine, essentielle à la liaison d'Ubc9 avec les protéines SUMO, a été remplacée par une sérine, rendant cette enzyme catalytiquement inactive (Gong et al., 1997; van Wijk and Timmers, 2010).

Les plasmides codant pour la protéine TRAF5 ou pour le mutant TRAF5 DN (*Dominant Negative*) tronqué de sa région catalytique (Wong et al., 1998), chacune fusionnée à une étiquette Myc, ont été obtenus auprès du Dr. Bharat Aggarwal (University of Texas). Les constructions codant pour la protéine Ubc13 ou pour le mutant Ubc13 DN, chacune associée à une étiquette HA (Influenza Hemagglutinin), ont été données par le Dr. Edward William Harhaj (University of Miami). Cette enzyme Ubc13 DN est inactive puisqu'elle est mutée au niveau d'une cystéine en position 87, qui est essentielle pour la formation des chaînes d'ubiquitine liées en K63 (Deng et al., 2000; Shembade et al., 2007).

Le plasmide codant pour la protéine IKK α fusionnée à une étiquette Myc, ainsi que celui codant pour IKK β associée à une étiquette VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus-G*) ou celui codant pour NEMO associée à une étiquette HA, nous ont été fournis par le Dr. Robert Weil (Institut Pasteur, Paris). Le mutant de NEMO (L329P) incapable de se lier à des chaînes d'ubiquitine et donc d'activer la voie NF- κ B, a été décrit dans (Wu et al., 2006).

Anticorps primaire	Dilution	Référence	Techniques dans lesquelles il a été utilisé
anti-Tax	1/300 1/500	sera de patients infectés par HTLV-1	Immunoblot Immunofluorescence
anti-Tax (monoclonal)	1/1000 1/100	168-A51 (NIH)	Co-immunoprécipitation Immunofluorescence
anti-HA	1/500	12CA5 (Roche)	Immunoblot
anti-Myc	1/2000	9E10 (Gentaur)	Immunoblot
anti-VSV-G	1/2000	V5507 (Sigma-Aldrich)	Immunoblot
anti-Ubc9	1/200	sc-10759 (Santa Cruz)	Immunoblot
anti-Ubc13	1/200	54186 (Anaspec)	Immunoblot
anti-SUMO-1	1/1000	4930S (Cell Signaling)	Immunoblot
anti-SUMO-2/3	1/1000	ab3742 (Abcam)	Immunoblot
anti-Ub-K63	1/500	5621S (Cell Signaling)	Immunoblot
anti-P4D1	1/500	sc-8017 (Santa Cruz)	Immunoblot
anti-Fk2	1/500	ST1200 (Calbiochem)	Immunoblot
anti-Phospho-IKKα/β	1/1000	2078 (Cell Signaling)	Immunoblot
anti-NEMO	1/200	sc-8330 (Santa Cruz)	Immunoblot
anti-RelA (ou p65)	1/200	sc-8008 (Santa Cruz)	Immunofluorescence

TABLEAU 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans nos travaux.

Le plasmide pGL4.32 (Promega) contient un gène luciférase Firefly de luciole (Luc2P), sous contrôle d'un promoteur possédant cinq éléments de réponse κ B, ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine. Le plasmide pRL-TK (Promega), permettant la normalisation des activités luciférase mesurées, dispose d'un gène luciférase Renilla de méduse, sous contrôle du promoteur constitutif de la Thymidine Kinase (TK).

Enfin, les siARN (*small interfering ARN*) Ubc9 (sc-36773) et Ubc13 (sc-43551) ont été obtenus auprès de Santa Cruz et ils ont été utilisés avec le siARN contrôle du même fournisseur (siRNA-A, sc-37007).

Le siARN TRAF5 (séquence GGGGTCACACCTGTCCCTATA) a été synthétisé par Qiagen et il a été employé avec le siARN contrôle du même fournisseur (GFP-22, réf. 1022064).

I.3. Anticorps

Afin de détecter nos protéines d'intérêt, nous avons utilisé plusieurs types d'anticorps primaires répertoriés dans le **TABLEAU 3**.

La protéine Tax1 a été identifiée grâce à un mélange de sera de patients infectés par le virus HTLV-1 lors des immunoblots et des immunofluorescences tandis qu'un anticorps monoclonal a été employé pour les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence.

Pour cibler les protéines possédant l'étiquette HA (HA-Ub, HA-SUMO-3, HA-NEMO, HA-Ubc13 et HA-Ubc13 DN), un anticorps anti-Hémagglutinine a été utilisé. De même, nous avons eu recours à un anticorps anti-Myc pour mettre en évidence les protéines fusionnées à cette étiquette (Myc-TRAF5, Myc-TRAF5 DN et Myc-IKK α) ainsi qu'à un anticorps anti-VSV-G pour détecter la protéine VSV-G-IKK β .

Pour visualiser les modifications post-traductionnelles endogènes des protéines, nous avons utilisé les anticorps anti-SUMO-1, anti-SUMO-2/3, anti-chaînes d'ubiquitine liées en K63 et un mélange d'anticorps anti-ubiquitine totale P4D1 et Fk2.

Enfin, lors des immunoblots, nous avons utilisé plusieurs anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (HRP, *Horseradish peroxidase*) : un anticorps anti-humain (W4031, Promega), un anticorps anti-souris (W4021, Promega), un anticorps anti-lapin (W4011, Promega) et un anticorps anti-chèvre (W8051, Promega).

De même, en immunofluorescence, différents anticorps secondaires couplés à des fluorophores ont été employés : un anticorps anti-humain couplé au FITC (*Fluorescein Isothiocyanate* A11013, Invitrogen), un anticorps anti-souris couplé au FITC (A11001, Invitrogen) et un anticorps anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 647 (A-21236, Invitrogen).

II. MÉTHODES

Au cours de nos travaux, nous avons principalement employé des techniques de biologie cellulaire et moléculaire. Nos expériences se basent notamment sur la transfection de cellules réalisée à partir de protocoles optimisés pour chaque lignée cultivée au laboratoire, ainsi que sur la méthode d'analyse des protéines par immunoblot. Cette technique, découverte en 1979 par Harry Towbin (Towbin et al., 1979), reste privilégiée par de nombreuses équipes de recherche, dont la nôtre, pour étudier l'expression de protéine d'intérêt.

Par ailleurs au sein de notre laboratoire, nous avons développé une certaine expertise dans une technique de biologie moléculaire spécifique, qui est la purification de protéine possédant une étiquette 6-Histidines sur billes de nickel. Cette méthode de purification permet de récupérer spécifiquement une protéine d'intérêt, sans ses potentiels partenaires cellulaires liés de façon non covalente, du fait de l'utilisation de tampons très stringents. Ainsi, grâce à cette technique, nous avons pu analyser de façon précise les modifications post-traductionnelles de protéine, et plus particulièrement celles de la protéine Tax.

D'autres techniques sont également appliquées au laboratoire comme des expériences de transactivation de promoteur, d'immunofluorescence ou encore de RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*).

II.1. Transfection transitoire

Au sein de notre équipe, nous avons développé des protocoles de transfection transitoire des plasmides et des siARN, adaptés aux différentes lignées cellulaires ainsi qu'aux techniques utilisées, afin d'optimiser le taux de transfection de ces cellules.

Concernant la lignée HEK 293T et HEK 293T NF- κ B stable, nous avons employé la méthode des précipités de phosphate de calcium dans les expériences de transactivation de promoteur, de RT-qPCR et d'immunofluorescence. Les plasmides et les siARN sont alors mélangés avec une solution saline HBS (*Hepes Buffered Saline 2X*, Sigma-Aldrich), pré-diluée au demi dans de l'eau stérile (2 μ g d'ADN dans 150 μ L d'HBS 1X/point pour les transfections en plaque 24 puits et 4 μ g d'ADN dans 500 μ L d'HBS 1X/point pour les transfections en boîte 10cm). Le CaCl₂ à 2M est ensuite ajouté goutte à goutte pour que de petits précipités ADN/siARN/CaCl₂ soient formés (10 μ L de CaCl₂/point pour les transfections en 24 puits et 2 \times 16 μ L/point pour les transfections en boîte). Le mélange est incubé environ 30min à température ambiante puis réparti goutte à goutte sur les cellules en culture (ajout de 75 μ L du mélange/puits et de 500 μ L/boîte). Après 6h d'incubation dans l'étuve à 37°C, le milieu de culture des cellules est changé.

Lors des expériences de purification de protéine sur billes de nickel et de co-immunoprécipitation (Co-IP), les cellules HEK 293T ont été transfectées avec de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), suivant le protocole établi par le fournisseur (8 à 12 μ g d'ADN et 25 μ L de Lipofectamine/point pour les transfections en boîte).

Enfin, les cellules HeLa utilisées pour les expériences d'immunofluorescence ont été transfectées avec du Fugene HD (Promega), suivant le protocole défini par le fournisseur (80ng d'ADN et 320ng de Fugene/point pour les transfections en plaque 96 puits).

Les lignées de cellules T CD4⁺ MOLT4 ont été transfectées avec du DMRIE-C (Invitrogen), suivant le protocole établi par le fournisseur, pour les expériences de purification de protéine sur billes de nickel et de transactivation de promoteur (7 μ g d'ADN/point pour les transfections en plaque 6 puits et 1 μ g/point pour les transfections en plaque 24 puits, avec un ratio d'1 μ g d'ADN pour 3 μ g de DMRIE-C).

II.2. Purification de protéine sur billes de nickel

L'une des techniques caractéristiques employées au laboratoire est la purification de protéine fusionnée à une étiquette 6-Histidines grâce à des billes de nickel (Chiari et al., 2004). Elle nous permet d'étudier spécifiquement les modifications post-traductionnelles de la protéine étiquetée, puisque la lyse des cellules ainsi que les lavages des billes sur lesquelles sont fixées les protéines d'intérêt, se déroulent dans des conditions hautement stringentes et dénaturantes. Ceci assure l'inactivation des déubiquitinylnases et des SUMO protéases afin de conserver les modifications post-traductionnelles mais également, l'élimination des potentielles protéines contaminantes, à l'exception des protéines liées de façon covalente aux protéines étiquetées 6His.

Pour réaliser cette expérience, la veille de la transfection nous mettons en culture des cellules HEK 293T dans des boîtes de 10cm de diamètre ($3,5 \cdot 10^6$ cellules/boîte) ou des cellules T MOLT4 dans des plaques 6 puits ($1,5 \cdot 10^6$ cellules/puits). 48h ou 72h après leur transfection, les cellules sont lysées dans un tampon A très dénaturant (6M Guanidine HCl, 0,1M NaH₂PO₄, 10mM Imidazole, pH8) puis les lysats sont soniqués (tour à tour 25s, 20s et 15s chacun). Une partie de ces lysats cellulaires (environ 1/10^{ème}) est conservée et l'autre est incubée avec 25µL de billes de nickel (His-select HF agarose beads, Sigma-Aldrich), pendant 3h à température ambiante sous agitation, afin que l'étiquette 6His des protéines d'intérêt se fixe au nickel des billes. A la suite de cette incubation, les billes sont successivement lavées trois fois dans le tampon A, puis deux fois dans un tampon B (tampon A dilué au quart dans un tampon d'élution C), et enfin deux fois dans le tampon C (25mM Tris-HCl [pH6,8], 10mM Imidazole). Les protéines fixées aux billes sont finalement éluées avec l'ajout de tampon Laemmli 2X chauffé (Sigma-Aldrich) puis analysées par immunoblot.

II.3. Co-immunoprécipitation

Cette méthode expérimentale, utilisée fréquemment dans notre équipe, permet d'isoler une protéine d'intérêt grâce à des anticorps dirigés contre celle-ci et d'identifier ses partenaires protéiques associés.

Pour effectuer cette technique, la veille de la transfection nous mettons en culture des cellules HEK 293T dans des boîtes de 10cm de diamètre ($3,5 \cdot 10^6$ cellules/boîte). 48h après leur transfection, les cellules sont lysées dans un tampon RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*) (Tris-HCl 50mM [pH8], NaCl 150mM, NP40 1%, désoxycholate de sodium 0,5%, SDS 0,1%),

additionné d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (88665 et 88667, Thermo Scientific), et incubées 20min à 4°C dans ce tampon. Une partie des lysats obtenus (environ 1/10^{ème}) est alors conservée et dans l'autre, nous ajoutons 2µL d'anticorps monoclonaux anti-Tax puis nous les plaçons toute la nuit à 4°C sous agitation, afin que les anticorps se fixent à leurs protéines cibles. A la suite de cette incubation, nous ajoutons 75µL de billes de sépharose couplées de façon covalente à la protéine G (17-0618-01, GE Healthcare). Les lysats sont alors remis sous agitation 1h à 4°C, afin que la protéine G se fixe aux anticorps et précipite les complexes immuns formés. Les billes sont ensuite lavées cinq fois avec un tampon de rinçage (Tris-HCl 20mM [pH8], NaCl 10mM, EGTA 0,2mM, NaF 0,2mM, désoxycholate de sodium 0,2%, NP40 0,5%), additionné d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Roche). Enfin, les protéines fixées aux billes sont éluées avec l'ajout de tampon Laemmli 2X chauffé (Sigma-Aldrich) puis analysées par immunoblot.

II.4. Immunoblot et quantification

La technique d'immunoblot constitue généralement l'étape suivante de nombreuses expériences comme la purification de protéine sur billes de nickel ou la co-immunoprécipitation, puisqu'elle permet d'analyser l'expression des protéines purifiées par les billes ou présentes dans les lysats, obtenues lors de ces expériences.

Les lysats sont mélangés au demi dans du tampon Laemmli 2X puis chauffés 5min à 100°C, tout comme les protéines purifiées, déjà reprises dans le tampon Laemmli. Les échantillons sont ensuite déposés dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* NuPAGE Novex 4-12% ou 10% Bis-Tris Protein Gels, Invitrogen). A la suite de cette migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Optitran, Merck) ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF *Polyvinylidene Difluoride*, RPN303F, GE Healthcare). Cette membrane est alors incubée dans une solution de TBS (*Tris-Buffered Saline*)/5% lait, afin de saturer les sites pouvant fixer de façon non spécifique les anticorps. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt puis, après six lavages dans un tampon TBS/0,1% TWEEN (Sigma-Aldrich), avec les anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires et couplés à une HRP. Enfin, la membrane est de nouveau lavée six fois dans du tampon TBS/0,1% TWEEN. Pour les incubations, les anticorps sont dilués dans une solution de TBS/0,1% TWEEN/5% lait ou 5% BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich).

L'ajout du substrat de la peroxydase sur la membrane (kits Luminol, Santa Cruz ou kits ECL⁺, GE Healthcare) engendre une réaction chimioluminescente (Ryan et al., 1994), détectable grâce à une caméra (Fusion-FX, Vilber Lourmat), permettant ainsi de visualiser les protéines d'intérêt et leur expression.

Les signaux obtenus sont ensuite analysés et quantifiés via le logiciel ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Pour chaque expérience, le signal correspondant au bruit de fond est mesuré à partir de la piste dite « Contrôle » puis soustrait des mesures obtenues pour les pistes à analyser. Les quantités mesurées pour les protéines d'intérêt (Phospho-IKK α/β , NEMO, HA-NEMO, Myc-IKK α ou encore VSV-G-IKK β par exemple) ainsi que celles mesurées pour les modifications post-traductionnelles de Tax, sont normalisées sur la quantité de Tax non conjuguée mesurée à partir de l'immunoblot anti-Tax, après soustraction du bruit de fond. Enfin, pour l'immunoblot anti-Phospho-IKK α/β , les quantités mesurées correspondent aux signaux des deux bandes d'IKK α et d'IKK β phosphorylées associées.

II.5. Immunofluorescence

II.5.1. Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine Tax

Cette méthode permet d'étudier la distribution de la protéine Tax dans la cellule et donc, ses potentiels changements de localisation.

Pour réaliser cette expérience, la veille de la transfection nous mettons en culture des cellules HEK 293T sur des lamelles de verre placées dans des plaques 24 puits (3.10^4 cellules/puits). 24h après leur transfection, les cellules sont marquées. Les lamelles sont d'abord lavées deux fois avec du tampon PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*, Life Technologies), puis les cellules sont fixées 15min à température ambiante avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%. Elles sont ensuite de nouveau lavées deux fois avec du PBS 1X, puis perméabilisées 5min à -20°C avec du méthanol froid. Les cellules sont encore lavées deux fois avec du PBS 1X et saturées 30min à température ambiante avec une solution de PBS 1X/2% BSA/0,1% TWEEN. A la suite de cette saturation, elles sont incubées successivement avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt (1h à température ambiante), puis avec les anticorps secondaires (45min à température ambiante), spécifiques des anticorps primaires et couplés à un fluorophore. Pour ces incubations, les anticorps sont dilués dans une solution de PBS 1X/2% BSA/0,1% TWEEN et entre chaque incubation, les cellules sont lavées trois fois 5min avec du PBS 1X/0,1% TWEEN.

Nous incubons ensuite les cellules 15min à température ambiante avec du DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich), dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS 1X, permettant la coloration du noyau (Russell et al., 1975). Enfin, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X, puis les lamelles sont montées sur des lames grâce à un liquide de montage (FluorSave Reagent, Calbiochem).

Par la suite, les marquages cellulaires sont observés en microscopie confocale grâce à un microscope SPINNING DISK LEICA, avec un objectif 63X. Les images sont acquises avec le logiciel Métamorph, puis analysées en utilisant le logiciel ImageJ.

II.5.2. Etude de la translocation nucléaire de la protéine RelA

En collaboration avec l'équipe du Dr. Arrieumerlou (Inserm, UMR 8104, Paris), nous avons également employé un autre protocole d'immunofluorescence mis au point au sein de leur laboratoire. Ces expériences nous ont permis d'analyser l'effet de certaines protéines d'intérêt sur la translocation nucléaire de RelA (ou p65), dans le cadre d'une activation de la voie NF-κB induite par Tax.

Dans ce protocole, des cellules HeLa sont mises en culture la veille de la transfection dans des plaques 96 puits (7000 cellules/puits) avec un milieu DMEM sans antibiotiques, pour favoriser la transfection. 10h, 16h ou 48h après leur transfection, les cellules sont marquées. Certaines sont d'abord incubées 30min à 37°C avec un milieu DMEM contenant 100ng/mL de PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* P1585-1MG, Sigma-Aldrich), connue pour activer la voie NF-κB. Ces cellules serviront de contrôle positif pour la translocation nucléaire de RelA. Toutes les cellules (stimulées ou non à la PMA) sont ensuite fixées 10min à température ambiante avec du PFA 4%, puis lavées trois fois avec du PBS 1X. Elles sont alors perméabilisées 10min à température ambiante avec une solution de PBS 1X/0.1% Triton 100X et lavées deux fois avec du PBS 1X/0.5% BSA. A la suite de ces lavages, les cellules sont incubées successivement avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt (2h à température ambiante sous agitation ou toute la nuit à 4°C), puis avec les anticorps secondaires mélangés au Hoechst, dilué au 1/10000^{ème}, qui comme le DAPI se lie à l'ADN cellulaire (45min à température ambiante sous agitation). Pour ces incubations, les anticorps sont dilués dans une solution de PBS 1X/0.5% BSA et entre chaque incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X/0.5% BSA. Enfin, nous lavons les cellules trois fois avec du PBS 1X/0.5% BSA et deux fois avec du PBS 1X, puis nous les conservons à 4°C.

Les marquages cellulaires sont ensuite observés grâce à un microscope à champs large HERMES avec un objectif 10X et grâce à un microscope à champs large ImageXpress MICRO XLS (Molecular devices) avec un objectif 20X (Plateforme de Biologie Cellulaire à l'Institut Gustave Roussy, Villejuif). Les images obtenues sont acquises avec les logiciels WiScan ou MétaExpress, puis analysées en utilisant le logiciel ImageJ.

II.6. Transactivation de promoteur

Lors de nos travaux, nous avons utilisé la technique de transactivation de promoteur pour analyser l'impact de protéine d'intérêt sur l'activation spécifiquement induite par Tax de promoteur comprenant des éléments de réponse κ B.

Pour effectuer cette expérience, la veille de la transfection nous mettons en culture des cellules adhérentes HEK 293T ou HEK 293T NF- κ B stable (3.10^4 cellules/puits) ou encore des cellules T MOLT4 (4.10^5 cellules/puits) dans des plaques 24 puits. 48h après leur transfection avec les siARN et les plasmides, les cellules sont de nouveau transfectées avec les promoteurs pGL4.32 et pRL-TK. Le plasmide pGL4.32, qui contient un gène luciférase Firefly sous contrôle d'un promoteur possédant cinq éléments de réponse κ B, permet de mesurer l'activation des promoteurs NF- κ B induite spécifiquement pas Tax. Le plasmide pRL-TK possède un gène luciférase Renilla sous contrôle du promoteur constitutif de la Thymidine Kinase et permet la normalisation des activités Firefly mesurées car l'activité Renilla reflète l'activité transcriptionnelle de base dans les cellules. Dans le cas des cellules HEK 293T NF- κ B stable, qui contiennent le promoteur pGL4.32 intégré stablement dans leur chromatine, seul le plasmide pRL-TK est transfecté. 24h après cette seconde transfection, les cellules sont lysées et leur activité luciférase est mesurée avec un luminomètre, grâce au kit « Dual-Luciferase reporter assay system » (Promega). Les activités Firefly et Renilla mesurées sont distinctes car ces deux enzymes n'ont ni les mêmes substrats, ni les mêmes spectres d'émission. En effet, l'enzyme Firefly catalyse une réaction produisant un spectre d'émission situé entre 550 et 570nm, tandis que l'enzyme Renilla produit un spectre d'émission vers 480nm.

Pour chaque condition, nous calculons le ratio « activité Firefly/activité Renilla » afin de normaliser les valeurs obtenues pour la luciférase Firefly et ainsi, nous affranchir de potentielles variabilités biologiques et expérimentales, liées aux différences de taux de transfection ou de lyse des cellules. Les différences de ratio observées entre les conditions analysées reflètent donc directement les différences d'activation du promoteur NF- κ B dans ces conditions.

Par ailleurs, chaque condition est réalisée en double ce qui nous permet également de vérifier l'absence de variations entre les deux points d'une même condition, confortant nos analyses et les différences de ratio constatées. Une moyenne pour chaque condition est établie entre les deux ratios obtenus, puis chaque moyenne est normalisée par rapport au ratio moyen de la protéine Tax, transfectée avec les plasmides ou les siARN contrôles (fixé à 100%).

II.7. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

La quantification relative des ARN messagers (ARNm) présents dans les cellules par la méthode de RT-qPCR, nous a permis d'analyser l'effet de protéine d'intérêt sur l'activation de la transcription de gènes cellulaires induite par Tax via la voie NF- κ B.

Pour réaliser cette technique, la veille de la transfection nous mettons en culture des cellules HEK 293T dans des boîtes de 10cm de diamètre ($1,5 \cdot 10^6$ cellules/boîte). 72h après leur transfection, les cellules sont lysées et les ARN totaux sont récupérés grâce au kit « NucleoSpin RNAII » (Macherey-Nagel). 1 μ g des ARN totaux extraits est ensuite utilisé pour effectuer la réaction de transcription inverse avec le kit « Maxima first-stand cDNA synthesis » (Thermo-Scientific), suivant le protocole établi par le fournisseur. La qPCR est alors réalisée à partir de 10ng de transcrits inverses d'ARN obtenus (correspondant à des ADNc dits complémentaires des brins d'ARN), dans un appareil Light-Cycler 2.0 (Roche). Nous avons analysé par qPCR l'expression des gènes Tax et ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), connu pour être induite par Tax via la voie NF- κ B (Sanda et al., 2006), ainsi que l'expression du gène endogène de ménage HPRT (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*), qui code pour une enzyme impliquée dans le recyclage métabolique des nucléotides et qui a une expression constitutive, non régulée et stable dans les cellules. Pour effectuer ces analyses qPCR, nous avons employé des amorces spécifiques pour Tax (forward 5'TTCCCAGGGTTTGGACAGAG3', reverse 5'GATGGGGTCCCAGGTGATCT3'), pour ICAM-1 (n° 04685105001, Roche) et pour HPRT (forward 5'TGACACTGGCAAACAATGCA3', reverse 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGC3').

La technologie SYBR Green (Schneeberger et al., 1995) nous a permis de réaliser les qPCR de Tax et d'HPRT, avec le protocole suivant : une première étape de dénaturation pendant 8min à 95°C, puis 40 cycles composés d'une phase de dénaturation (0s à 95°C), suivis d'une phase d'hybridation des amorces (10s à 60°C) et pour terminer, d'une phase d'élongation (8s à 72°C) et enfin, une étape finale pour achever l'amplification (0s à 95°C, puis 15s à 65°C et 60s à 95°C).

ICAM-1 a été amplifié, quant à lui, grâce à la technologie Taqman (Holland et al., 1991) en utilisant le protocole suivant : une première étape de dénaturation pendant 10min à 95°C, puis 45 cycles composés d'une phase de dénaturation (10s à 95°C), suivis d'une phase d'hybridation des amorces (30s à 60°C) et pour terminer, d'une phase d'élongation (1s à 72°C) et enfin, une étape finale d'élongation (5min à 72°C).

Pour chaque condition, les quantités d'ARNm obtenues pour Tax et ICAM-1 sont normalisées par rapport à celles des ARNm d'HPRT, ce qui nous permet de contrôler la quantité et la qualité des ARNm ainsi que les efficacités de la transcription inverse et de la qPCR. Par ailleurs, chaque condition est réalisée en double ce qui nous permet également de vérifier l'absence de variations entre les deux points d'une même condition. Une moyenne pour chaque condition est établie entre les deux quantités normalisées obtenues, puis chaque moyenne est normalisée une nouvelle fois mais par rapport à la quantité moyenne d'ARNm dans les cellules qui ont été transfectées avec le plasmide Tax et les plasmides ou les siARN contrôles (fixée à 100%).

Résultats

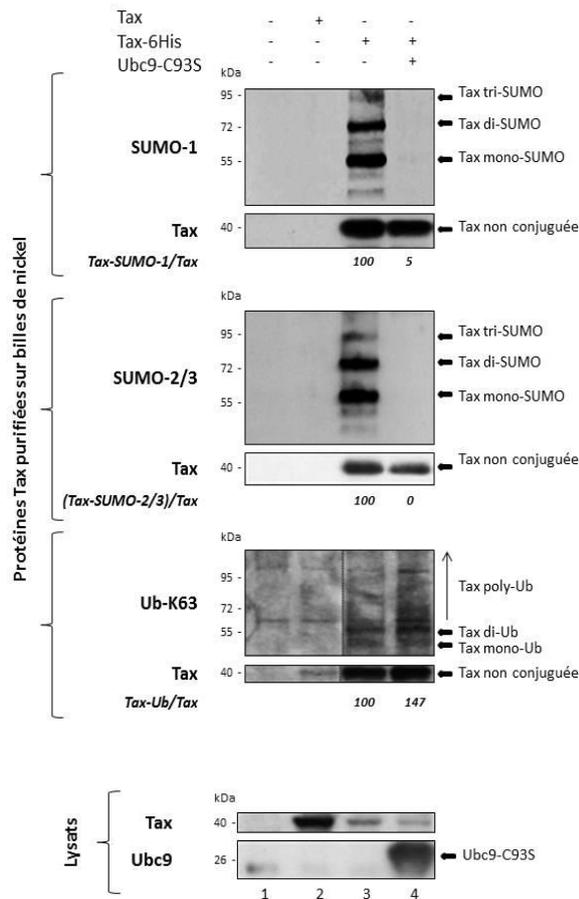
I. LA SUMOYLATION DE TAX : UN ÉVÉNEMENT NON ESSENTIEL POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

L'importance de la SUMOylation de la protéine Tax dans le cadre de l'activation de la voie NF- κ B a été remise en question par des travaux menés au sein de notre laboratoire (Bonnet et al., 2012). Suite à la controverse soulevée par notre étude (Shirinian et al., 2013; Turci et al., 2012; Zane and Jeang, 2012), nous avons décidé de réexaminer complètement l'importance de cette modification post-traductionnelle de la protéine Tax dans l'activation de la voie NF- κ B.

Pour cela, nous avons élaboré une nouvelle stratégie basée sur l'inhibition de la machinerie de SUMOylation endogène des cellules. En effet, dans le mécanisme de SUMOylation des protéines, une seule enzyme E2 de conjugaison a été décrite à ce jour, l'enzyme Ubc9 (Varadaraj et al., 2014; Wilkinson and Henley, 2010). En inhibant Ubc9, il est donc possible de stopper l'ensemble du processus de SUMOylation endogène dans les cellules. Nous avons choisi soit de bloquer l'expression de l'enzyme Ubc9 endogène, en utilisant des siARN dirigés contre cette protéine, soit de bloquer son activité endogène, en employant un mutant catalytiquement inactif, Ubc9-C93S, dans lequel la cystéine du domaine conservé UBC a été mutée en sérine, empêchant le transfert des SUMO de l'enzyme E2 aux protéines cibles. Ce mutant d'Ubc9 a été décrit comme pouvant inhiber totalement la machinerie de SUMOylation endogène dans les cellules (Gong et al., 1997).

Avec cette nouvelle stratégie, ayant l'avantage de ne pas utiliser de mutants de la protéine Tax, nous avons pu analyser de façon spécifique le rôle de la SUMOylation de Tax sur l'activation de la voie NF- κ B qu'elle contrôle.

A.



B.

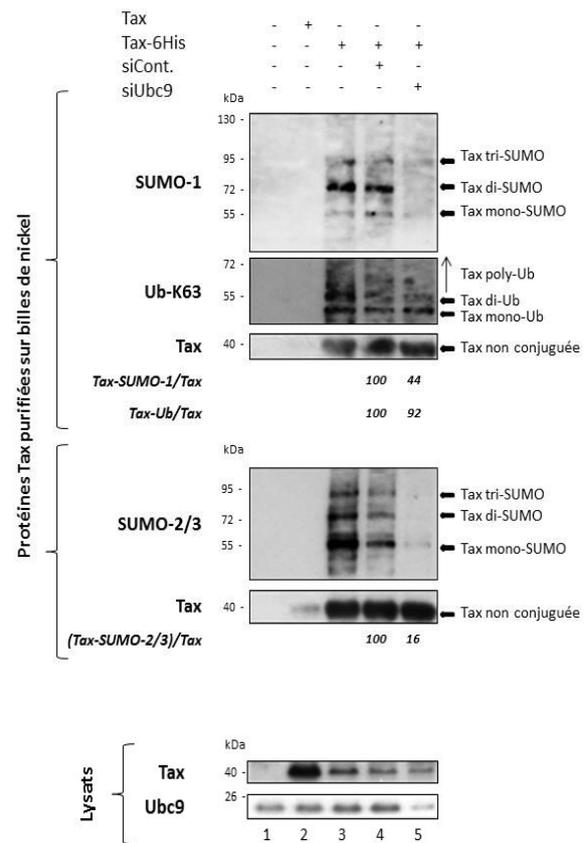


FIGURE 53 : La SUMOylation endogène de Tax est fortement et spécifiquement diminuée par le blocage d'Ubc9.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec, (A.) soit un plasmide codant pour le mutant T7-Ubc9-C93S ou un plasmide pSG5m contrôle, (B.) soit des siARN Ubc9 ou des siARN contrôles. 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression des protéines Tax et Ubc9 (A. et B., lysats) et l'autre a été purifiée avec des billes de nickel afin d'isoler la protéine Tax-6His. Les protéines Tax purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot. En A., trois gels séparés ont été préparés puis analysés avec successivement pour le premier l'anticorps anti-SUMO-1 puis un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax), pour le deuxième l'anticorps anti-SUMO-2/3 puis le mélange de sera et enfin pour le troisième, l'anticorps anti-Ub-K63 suivi du mélange de sera. En B., deux gels séparés ont été utilisés avec successivement pour le premier les anticorps anti-SUMO-1, anti-Ub-K63 et enfin le mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax) et pour le deuxième, l'anticorps anti-SUMO-2/3 suivi du mélange de sera. (A. et B.) La quantité de protéines Tax SUMOylées ou ubiquitinylées a été mesurée puis normalisée sur celle des protéines Tax non conjuguées ($Tax-SUMO-1/Tax$, $(Tax-SUMO-2/3)/Tax$ ou $Tax-Ub/Tax$). Les pourcentages de formes modifiées de Tax indiqués sous chaque figure ont été calculés en fonction de ceux obtenus pour les protéines Tax seules ou pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixés à 100%).

I.1. Le blocage d'Ubc9, une stratégie efficace pour inhiber la SUMOylation de Tax et la machinerie de SUMOylation endogène

Pour vérifier l'efficacité de notre stratégie, nous avons analysé la SUMOylation endogène de la protéine Tax, lors du blocage de l'activité ou de l'expression de l'enzyme Ubc9 dans les cellules. Pour cela, nous avons purifié la protéine Tax, fusionnée à une étiquette 6-Histidines, sur billes de nickel afin d'étudier ses modifications post-traductionnelles dans les conditions de blocage (**FIGURE 53**). Nous avons tout d'abord transfecté des cellules HEK 293T avec le plasmide Tax-6His et avec, soit la construction codant pour la protéine Ubc9 mutée (Ubc9-C93S) ou un plasmide pSG5m contrôle (**FIGURE 53A**), soit les siARN Ubc9 (siUbc9) ou des siARN contrôles (siCont.) (**FIGURE 53B**). Les protéines Tax-6His ont ensuite été purifiées sur billes de nickel grâce à leur étiquette, puis leurs modifications post-traductionnelles ont été analysées par immunoblot. La SUMOylation endogène de Tax a été révélée avec des anticorps anti-SUMO-1 et anti-SUMO-2/3 tandis que son ubiquitinylation avec des chaînes endogènes d'ubiquitine liées en K63, servant de contrôle, a été observée avec l'anticorps anti-Ub-K63. Les signaux mesurés pour les modifications de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour Tax seule ou Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100%.

Des formes de Tax conjuguées à des protéines SUMO-1, SUMO-2/3 ou à des chaînes d'ubiquitine K63, sont purifiées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURES 53A et 53B**, piste 3) mais pas avec le plasmide Tax codant pour une protéine non étiquetée (**FIGURES 53A et 53B**, piste 2) ou avec le vecteur contrôle (**FIGURES 53A et 53B**, piste 1). Les billes de nickel ont donc fixé spécifiquement les protéines avec l'étiquette 6His, validant nos expériences. Par ailleurs, des bandes de poids moléculaires supérieurs à 40kDa (Tax non conjuguée) sont détectées avec les anticorps spécifiques des modifications post-traductionnelles. Les bandes observées avec l'anticorps anti-Ub-K63 correspondent aux formes de Tax mono et polyubiquitinylées. De même avec les anticorps anti-SUMO-1 et anti-SUMO-2/3, ce sont les formes mono et polySUMOylées de Tax qui sont visibles. Les protéines SUMO-2/3 étant capables de former des chaînes en s'associant entre elles, ce sont ces chaînes de différentes tailles (di- ou tri-SUMO) que nous observons. Les protéines SUMO-1 ne pouvant s'associer en chaînes, les formes de Tax di- ou tri-SUMO visibles correspondent à des protéines SUMO-1 situées à l'extrémité des chaînes de SUMO-2/3

ou encore à deux ou trois SUMO-1 fixées sur différentes lysines cibles de Tax (Matic et al., 2008).

En présence d'Ubc9-C93S, la SUMOylation de Tax avec des protéines SUMO-1 ou SUMO-2/3 est considérablement diminuée par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURE 53A**, pistes 3 et 4) pour atteindre un niveau d'expression comparable à celui du bruit de fond. En revanche, l'expression de Tax non conjuguée n'est pas réduite, indiquant que la baisse drastique de la SUMOylation de Tax n'est pas due à une diminution de l'expression de la protéine. L'ubiquitinylation de Tax est également identique, avec ou sans le mutant Ubc9-C93S (**FIGURE 53A**, pistes 3 et 4), ce qui montre que ce mutant inhibe spécifiquement la SUMOylation de Tax.

Les mêmes importantes réductions de conjugaison de Tax aux protéines SUMO-1 ou SUMO-2/3 sont visibles avec les siARN Ubc9 par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 53B**, pistes 4 et 5) ou à Tax seule (**FIGURE 53B**, piste 3). L'expression de la protéine Tax non conjuguée ainsi que celle des protéines liées à des chaînes d'ubiquitine K63 restent inchangées avec les siUbc9, comme avec le mutant Ubc9-C93S (**FIGURE 53B**, piste 5).

Le blocage de l'enzyme Ubc9 endogène est confirmé par une forte expression du mutant Ubc9-C93S au niveau des lysats cellulaires (**FIGURE 53A**, lysats, piste 4) et par l'importante réduction d'expression d'Ubc9 (environ 80%) en présence des siARN spécifiques (**FIGURE 53B**, lysats, piste 5).

Ces expériences de purification, avec le mutant catalytique Ubc9-C93S et les siARN Ubc9, garantissent l'inhibition de la SUMOylation de la protéine Tax dans ces conditions, permettant ainsi de valider notre stratégie expérimentale. Grâce au blocage de l'activité ou de l'expression de l'unique enzyme de conjugaison dans les cellules, nous pouvons générer, sans mutations, une protéine Tax non SUMOylée mais ubiquitinylée à un niveau semblable à celui d'une protéine Tax sauvage.

Nous avons également étudié l'effet du mutant Ubc9-C93S et des siUbc9 sur la SUMOylation de l'ensemble des protéines cellulaires, afin de confirmer notre méthode d'inhibition (**FIGURE 54**). Comme précédemment, nous nous sommes basés sur la technique de purification de protéine sur billes de nickel mais dans ce cas, nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec la construction His-SUMO-3, en présence ou non du plasmide codant pour Ubc9-C93S ou des siARN Ubc9 ou contrôles (**FIGURE 54**). En parallèle, des cellules HEK 293T ont été transfectées avec le plasmide Tax-6His, associé ou non avec le plasmide Ubc9-C93S ou avec les siUbc9, afin de comparer l'inhibition de la SUMOylation

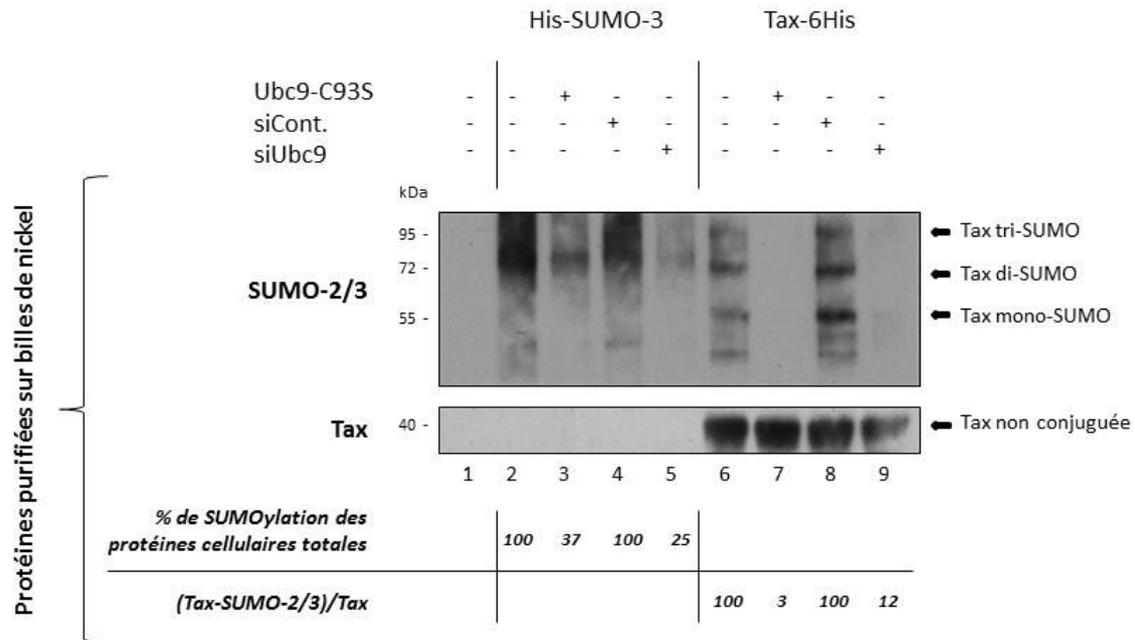


FIGURE 54 : Le processus de SUMOylation endogène des protéines est fortement réduit par le blocage d'Ubc9.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec, soit un plasmide pSG5m contrôle (piste 1), soit le plasmide codant pour la construction His-SUMO-3 (pistes 2 à 5) ou celui codant pour la protéine Tax-6His (pistes 6 à 9), en présence ou non du mutant T7-Ubc9-C93S (pistes 3 et 7), de siARN contrôles (pistes 4 et 8) ou de siARN Ubc9 (pistes 5 et 9). 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été purifiée avec des billes de nickel afin d'isoler les protéines étiquetées. Les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-SUMO-2/3 puis avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). Le pourcentage de SUMOylation des protéines cellulaires a été mesuré ainsi que la quantité de protéines Tax SUMOylées, normalisée sur celle des protéines Tax non conjuguées ((Tax-SUMO-2/3)/Tax)). Le pourcentage de SUMOylation des protéines en présence d'Ubc9-C93S a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines His-SUMO-3 ou Tax seules (fixé à 100%). De même, le pourcentage de protéines SUMOylées avec les siUbc9 a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines His-SUMO-3 ou Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixé à 100%).

de la protéine Tax à celle des protéines cellulaires totales. Les protéines étiquetées 6-Histidines ont été purifiées sur billes de nickel et leur conjugaison aux protéines SUMO-2/3 a été révélée par immunoblot avec l'anticorps anti-SUMO-2/3. De même que pour les expériences antérieures, les signaux correspondant aux formes SUMOylées de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour His-SUMO-3 ou Tax seules ainsi que pour His-SUMO-3 ou Tax transfectées avec les siARN contrôles ont été fixées à 100%.

La SUMOylation des protéines cellulaires est fortement réduite en présence du mutant Ubc9-C93S ainsi qu'avec les siUbc9 (**FIGURE 54**, pistes 3 et 5). Une inhibition de la conjugaison de Tax aux protéines SUMO-2/3, comparable à celles obtenues dans les **FIGURES 53A** et **53B**, est retrouvée avec Ubc9-C93S et avec les siARN Ubc9 (**FIGURE 54**, pistes 7 et 9).

Ces expériences au niveau des protéines cellulaires prouvent l'inhibition de la machinerie de SUMOylation endogène, induite par le blocage de l'activité ou de l'expression d'Ubc9.

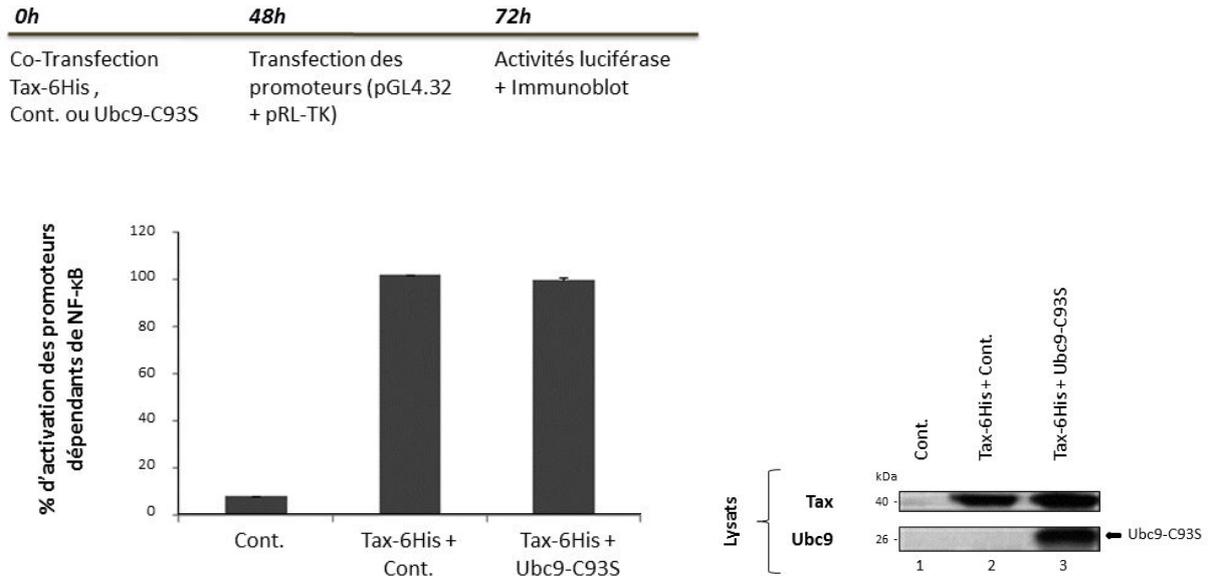
L'ensemble de ces résultats indique d'une part que le processus de SUMOylation dans les cellules est sous le contrôle de l'unique enzyme E2, Ubc9, et d'autre part que notre stratégie de blocage de cette enzyme permet de stopper ce processus et de générer une protéine Tax non SUMOylée, sans modification de son niveau d'ubiquitylation. Ces outils nous ont donc permis d'analyser précisément les rôles distincts de la SUMOylation et de l'ubiquitylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, sans mutation de Tax ni surexpression des protéines SUMO ou ubiquitine.

I.2. Une protéine Tax non SUMOylée active la transcription dépendante de NF- κ B

I.2.1. Analyse de l'activation de promoteur transfecté dépendant de NF- κ B lors du blocage d'Ubc9

Après avoir validé notre stratégie d'inhibition de la machinerie de SUMOylation dans les cellules HEK 293T, nous avons étudié la capacité d'une protéine Tax non SUMOylée, générée par le blocage d'Ubc9, à activer la voie NF- κ B dans ces lignées cellulaires.

A.



B.

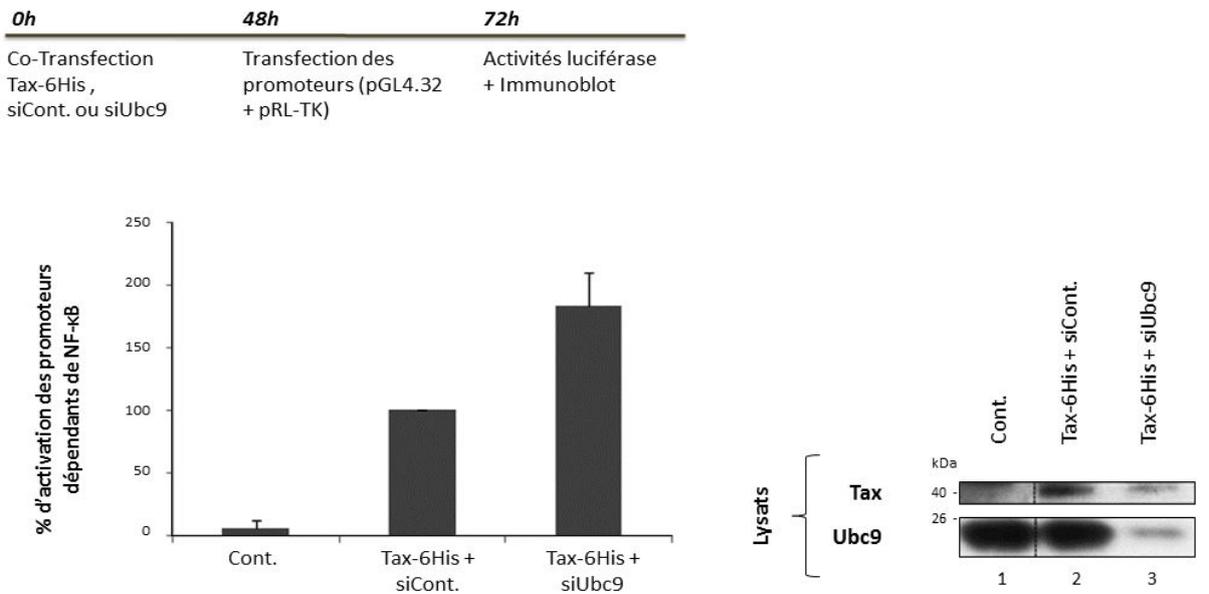


FIGURE 55 : Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κB transfectés.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec, **(A.)** soit un plasmide codant pour le mutant T7-Ubc9-C93S ou un plasmide pSG5m contrôle, **(B.)** soit des siUbc9 ou des siARN contrôles. 48h après, les cellules ont été soumises à une deuxième série de transfection avec la construction pGL4.32 (κB-Luc2P) et le plasmide pRL-TK permettant la normalisation des activités Firefly. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. En parallèle, l'expression des protéines Tax et Ubc9 a été analysée par immunoblot **(A. et B., lysats)**. Les pourcentages représentés sur les graphiques correspondent aux ratios « activité Firefly/activité Renilla » normalisés par ceux obtenus pour la protéine Tax seule ou avec les siARN contrôles (fixés à 100%). Ils représentent les moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes, réalisées en double.

Pour cela, nous avons eu recours à des expériences de transactivation de promoteur associé à des gènes rapporteurs luciférase (**FIGURE 55**). Nous avons commencé par transférer des cellules HEK 293T avec le plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec, soit la construction codant pour la protéine Ubc9 mutée (Ubc9-C93S) ou un plasmide pSG5m contrôle (Cont.) (**FIGURE 55A**), soit les siARN Ubc9 (siUbc9) ou des siARN contrôles (siCont.) (**FIGURE 55B**). 48h après, les cellules ont été transfectées une deuxième fois avec le promoteur pGL4.32, comprenant des éléments de réponse κ B, et avec le promoteur pRL-TK, constitutivement exprimé. Cette période de 48h entre les deux transfections nous a permis d'être dans les mêmes conditions que lors des expériences de purification de la protéine Tax (**FIGURES 53A et 53B**) et ainsi de nous assurer de l'inhibition de la SUMOylation de Tax au moment où les promoteurs ont été transfectés. Les cellules ont ensuite été lysées 24h après la deuxième série de transfection, puis les activités luciférase ont été mesurées. Les activités de la protéine Tax, exprimée seule ou avec les siARN contrôles, ont été arbitrairement fixées à 100%. En parallèle, l'expression des protéines Tax et Ubc9 a été analysée par immunoblot (**FIGURES 55A et 55B**, lysats).

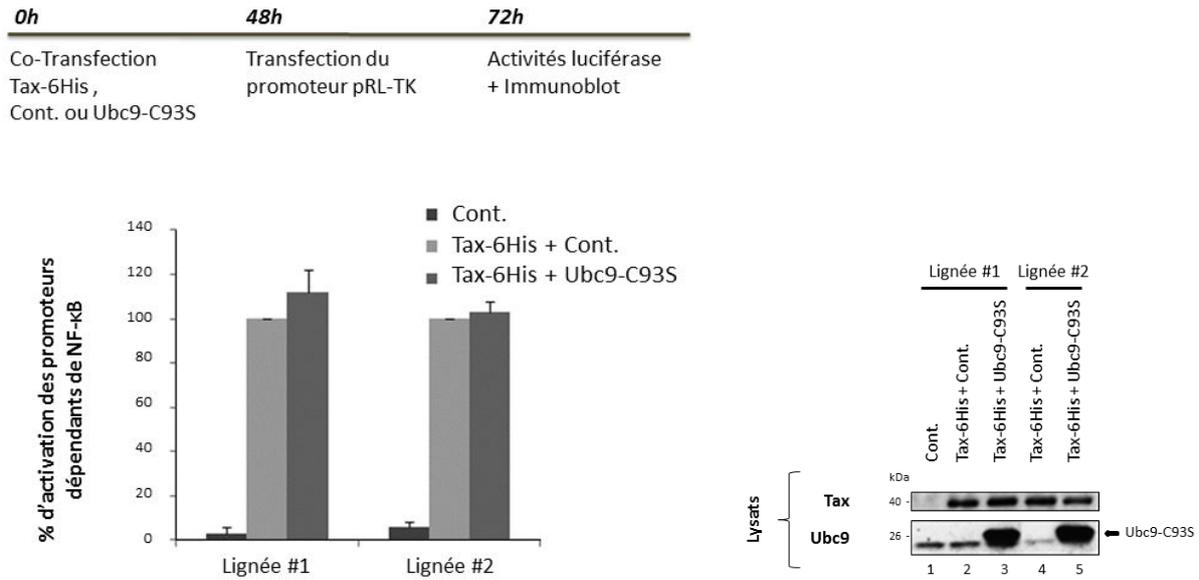
Comme attendu, dans les cellules HEK 293T en l'absence de Tax le niveau basal d'activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B est faible. L'ajout de la protéine Tax augmente significativement la transcription dépendante de NF- κ B, confirmant l'activation spécifique des promoteurs à éléments de réponse κ B par Tax (**FIGURES 55A et 55B**).

En présence d'Ubc9-C93S, le pourcentage d'activation des promoteurs dépendants de NF- κ B reste identique à celui observé avec la protéine Tax seule (**FIGURE 55A**). De la même manière, l'activation de la transcription à partir de ces promoteurs n'est pas diminuée avec les siUbc9, mais au contraire augmentée de façon importante par rapport à ce que nous obtenons avec les siARN contrôles (**FIGURE 55B**).

Au niveau des lysats cellulaires, la forte expression du mutant Ubc9-C93S (**FIGURE 55A**, lysats, piste 3) ainsi que l'inhibition presque complète (environ 90%) de l'enzyme endogène avec les siARN spécifiques (**FIGURE 55B**, lysats, piste 3), confirment le blocage d'Ubc9 dans les cellules.

Ces expériences de transactivation montrent qu'une protéine Tax non SUMOylée est capable d'activer des promoteurs transfectés dépendants de la voie NF- κ B au même niveau qu'une protéine Tax sauvage, dans les cellules adhérentes HEK 293T.

A.



B.

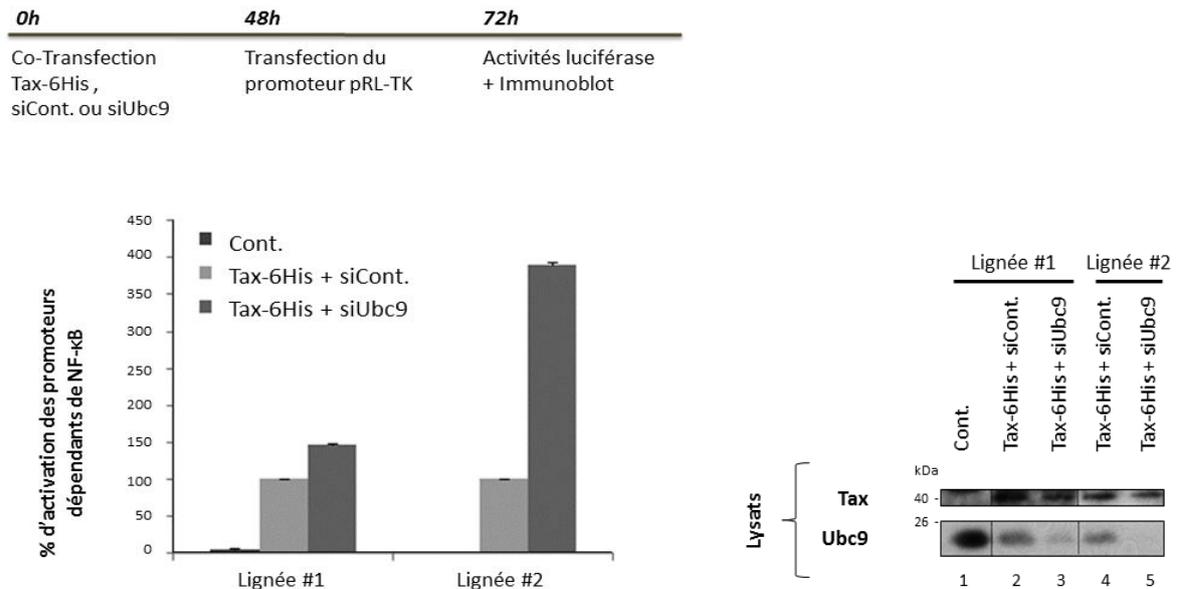


FIGURE 56 : Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κB intégrés.

Des cellules HEK 293T ayant intégré stablement dans leur chromatine un promoteur à éléments de réponse κB (HEK 293T NF-κB stable) ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec, (A.) soit un plasmide codant pour le mutant T7-Ubc9-C93S ou un plasmide pSG5m contrôle, (B.) soit des siUbc9 ou des siARN contrôles. 48h après, les cellules ont été transfectées une deuxième fois avec le plasmide pRL-TK. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. En parallèle, l'expression des protéines Tax et Ubc9 a été analysée par immunoblot (A. et B., lysats). Les pourcentages représentés sur les graphiques correspondent aux ratios « activité Firefly/activité Renilla » normalisés par ceux obtenus pour la protéine Tax seule ou avec les siARN contrôles (fixés à 100%). Ils représentent les moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes, réalisées en double.

1.2.2. Analyse de l'activation de promoteur intégré dépendant de NF- κ B lors du blocage d'Ubc9

Pour confirmer nos résultats précédents, nous avons étudié la capacité d'une protéine Tax non SUMOylée à activer la transcription dépendante de la voie NF- κ B à partir de promoteur intégré dans la chromatine, plus représentative d'une situation de transcription cellulaire (**FIGURE 56**). Au laboratoire, nous avons conçu des lignées de cellules, baptisées HEK 293T NF- κ B stable, ayant intégré un promoteur à éléments de réponse κ B au sein de leur chromatine. Deux des lignées cellulaires obtenues ont été transfectées avec le plasmide Tax-6His associé, dans un cas avec le mutant Ubc9-C93S ou avec un vecteur contrôle (Cont.) (**FIGURE 56A**), et dans l'autre avec les siUbc9 ou avec des siARN contrôles (siCont.) (**FIGURE 56B**). Comme précédemment, 48h après les cellules ont été transfectées une deuxième fois mais uniquement avec le promoteur pRL-TK, les éléments de réponse κ B étant déjà présents dans ces lignées cellulaires. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont finalement été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. Les activités de la protéine Tax, exprimée seule ou avec les siARN contrôles, ont de nouveau été fixées à 100% et l'expression des protéines Tax et Ubc9 a été analysée par immunoblot (**FIGURES 56A** et **56B**, lysats).

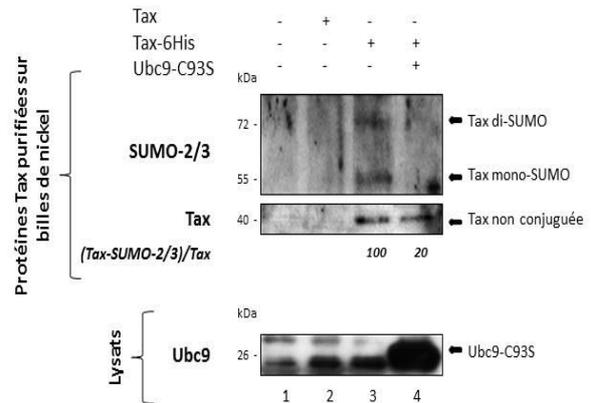
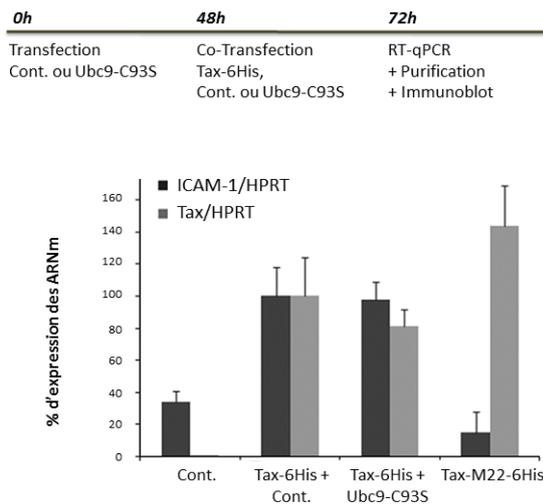
De la même façon que pour les **FIGURES 55A** et **55B**, la protéine Tax induit spécifiquement une forte activation des promoteurs dépendants de NF- κ B comparée à leur activité de base en l'absence de Tax (**FIGURES 56A** et **56B**).

Avec le mutant Ubc9-C93S, le pourcentage d'activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B reste inchangé dans les deux lignées cellulaires utilisées, par rapport à celui obtenu avec la protéine Tax seule (**FIGURE 56A**). De même, les siUbc9 n'induisent pas de diminution de l'activation des promoteurs mais plutôt une augmentation par rapport aux siARN contrôles, comme dans la **FIGURE 55B**, qui peut-être importante suivant la lignée cellulaire (**FIGURE 56B**).

L'expression massive du mutant (**FIGURE 56A**, lysats, pistes 3 et 5) ainsi que l'inhibition quasi-totale d'Ubc9 grâce aux siARN (**FIGURE 56B**, lysats, pistes 3 et 5) qui sont observées dans les lysats de chacune des lignées HEK 293T NF- κ B stable employées, garantissent le blocage de l'enzyme Ubc9 endogène.

Ces expériences de transactivations, réalisées avec des promoteurs intégrés stablement dans la chromatine des cellules HEK 293T, valident les résultats obtenus avec des promoteurs à éléments de réponse κ B transfectés dans ces mêmes lignées cellulaires.

A.



B.

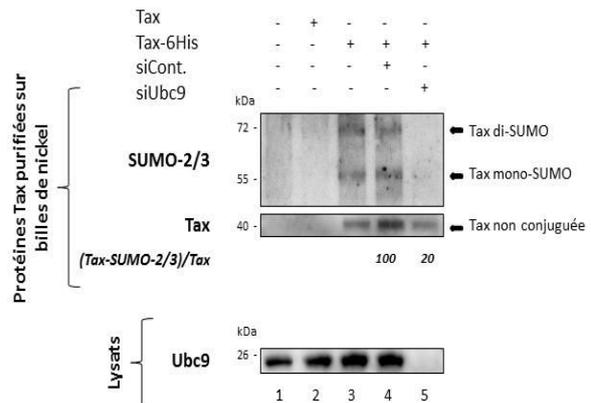
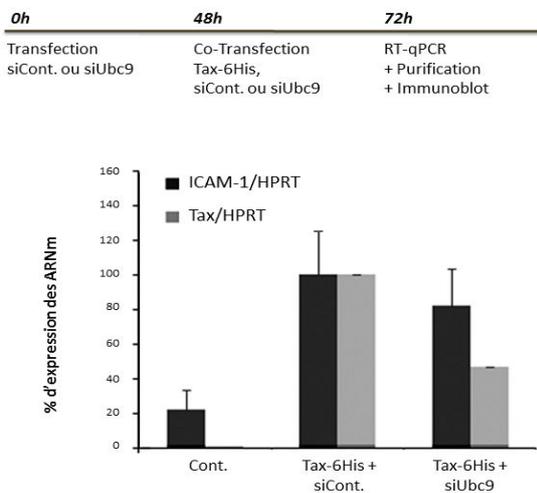


FIGURE 57 : Une protéine Tax non SUMOylée induit l'expression du gène endogène ICAM-1 dépendant de NF- κ B.

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec, (**A.**) soit un plasmide codant pour le mutant T7-Ubc9-C93S ou un plasmide pSG5m contrôle, (**B.**) soit des siUbc9 ou des siARN contrôles. 48h après, les cellules ont été de nouveau transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His associée, (**A.**) dans un cas au mutant Ubc9-C93S ou à un vecteur contrôle, (**B.**) dans l'autre cas aux siUbc9 ou à des siARN contrôles. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats a été utilisée pour les expériences de RT-qPCR (**A. et B.**, graphiques) et l'autre pour purifier la protéine Tax sur billes de nickel (**A. et B.**, montages). Les quantités d'ARNm Tax et ICAM-1 mesurées ont été normalisées sur celles obtenues pour HPRT. Ces valeurs ont été normalisées une seconde fois par les valeurs calculées pour la protéine Tax seule ou avec les siARN contrôles (fixées à 100%). Les pourcentages obtenus sont représentés sur les graphiques et ils correspondent aux moyennes et aux écarts-types de deux expériences indépendantes, réalisées en double. En parallèle, les protéines Tax purifiées ont été analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-SUMO-2/3 puis avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). L'expression de la protéine Ubc9 a été directement étudiée par immunoblot à partir de lysat cellulaire non purifié (**A. et B.**, lysats). La quantité de protéines Tax SUMOylées a été mesurée puis normalisée sur celle des protéines Tax non conjuguées ((Tax-SUMO-2/3)/Tax). Le pourcentage de formes modifiées de Tax en présence d'Ubc9-C93S a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines Tax seules (fixé à 100%), tandis que le pourcentage de Tax SUMOylées avec les siUbc9 a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixé à 100%).

I.3. Une protéine Tax non SUMOylée induit l'expression de gène endogène dépendant de NF- κ B

Pour continuer notre étude sur l'importance de la SUMOylation de Tax dans le cadre de l'activation de la voie NF- κ B induite par cette protéine, nous nous sommes intéressés à la capacité d'une protéine Tax non SUMOylée à activer un promoteur endogène dépendant de NF- κ B (**FIGURE 57**). Pour cela, nous avons réalisé des expériences de RT-qPCR afin d'analyser le niveau d'expression du gène ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), dont la transcription a été décrite comme étant activée par Tax via la voie NF- κ B (Sanda et al., 2006). Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec, soit le plasmide codant pour le mutant Ubc9-C93S ou un vecteur contrôle (Cont.) (**FIGURE 57A**), soit les siARN Ubc9 ou des siARN contrôles (siCont.) (**FIGURE 57B**). 48h après, les cellules ont été transfectées une deuxième fois avec le plasmide Tax-6His associé, dans la **FIGURE 57A** à Ubc9-C93S ou à un vecteur contrôle, et dans la **FIGURE 57B** aux siUbc9 ou à des siARN contrôles. Ce protocole permet d'inhiber la machinerie de SUMOylation endogène avant la transfection de Tax, pour s'assurer que la protéine Tax n'est pas SUMOylée au moment où elle active le promoteur. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats a été utilisée pour les expériences de RT-qPCR (**FIGURES 57A** et **57B**, graphiques à gauche) et l'autre pour purifier la protéine Tax sur billes de nickel et étudier sa SUMOylation endogène (**FIGURES 57A** et **57B**, montages à droite). Les pourcentages d'ARNm mesurés pour Tax et ICAM-1 ont été normalisés par rapport à ceux du gène endogène de ménage HPRT et les quantités d'ARNm Tax et ICAM-1, obtenues avec les plasmides ou siARN contrôles, ont été fixées à 100%. Concernant les purifications, les signaux mesurés pour les modifications de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour Tax seule ou Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100%.

Comme attendu, en l'absence de Tax, l'induction d'ICAM-1 est faible. La présence de la protéine Tax active fortement l'expression endogène d'ICAM-1, confirmant l'activation spécifique de ce gène par Tax (**FIGURES 57A** et **57B**, graphiques). Pour vérifier qu'ICAM-1 est bien induit par Tax via la voie NF- κ B, le mutant Tax-M22 a été employé comme contrôle négatif car il a été montré que cette protéine est incapable d'activer la voie NF- κ B cellulaire (Smith and Greene, 1990). En présence de Tax-M22, l'induction d'ICAM-1 est nulle (**FIGURE 57A**, graphique), prouvant que Tax active spécifiquement l'expression du gène ICAM-1 grâce à l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules HEK 293T.

La forte expression du mutant Tax-M22 exclue la possibilité que l'absence d'induction d'ICAM-1 soit due à une faible expression de Tax-M22, confortant le lien entre l'expression de ce gène et l'activation de la voie NF- κ B.

L'induction d'ICAM-1 reste inchangée avec le mutant Ubc9-C93S (**FIGURE 57A**, graphique) ou avec les siUbc9 (**FIGURE 57B**, graphique) par rapport à l'expression des ARNm ICAM-1 avec la protéine Tax seule ou avec les siARN contrôles.

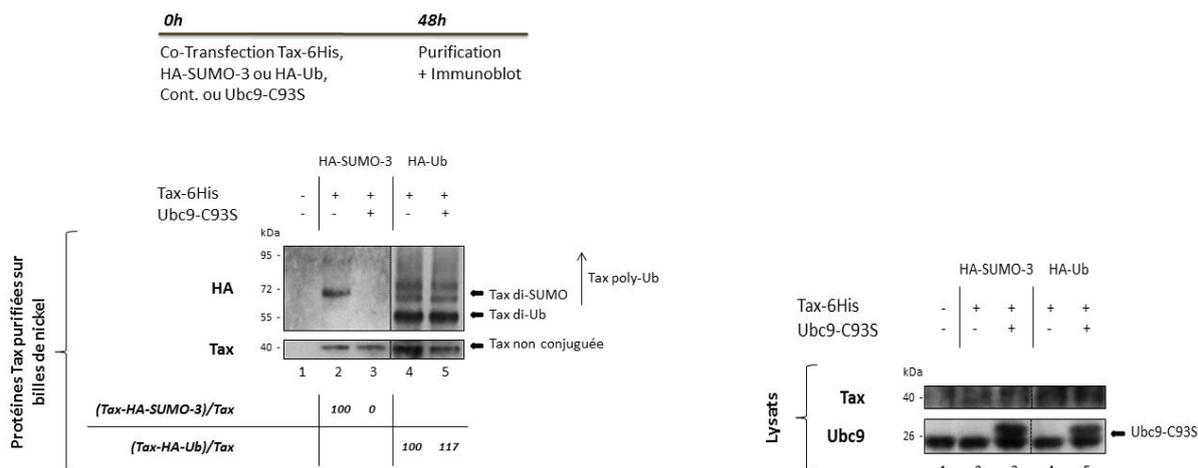
La purification de la protéine Tax sur billes de nickel nous a permis de vérifier l'inhibition de la SUMOylation endogène de Tax, dans les conditions de l'analyse RT-qPCR. Des formes de Tax conjuguées aux protéines SUMO-2/3 sont purifiées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURES 57A** et **57B**, montages piste 3) mais pas avec le plasmide Tax codant pour une protéine non étiquetée (**FIGURES 57A** et **57B**, montages piste 2) ou avec le vecteur contrôle (**FIGURES 57A** et **57B**, montages piste 1), validant nos expériences.

En présence d'Ubc9-C93S, la SUMOylation de Tax avec des protéines SUMO-2/3 est fortement réduite par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURE 57A**, montage pistes 3 et 4). De même, avec les siUbc9 la conjugaison de Tax aux SUMO-2/3 est diminuée de façon importante (**FIGURE 57B**, montage pistes 4 et 5). L'expression de Tax non conjuguée n'est pas réduite significativement en présence du mutant d'Ubc9 ou des siUbc9, confirmant que la baisse de la SUMOylation de Tax n'est pas due à une diminution de l'expression de la protéine.

Le blocage de l'enzyme Ubc9 endogène est confirmé par une forte expression du mutant Ubc9-C93S dans les lysats cellulaires (**FIGURE 57A**, lysats, piste 4) et par l'inhibition quasi-totale d'Ubc9 en présence des siARN spécifiques (**FIGURE 57B**, lysats, piste 5).

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'une protéine Tax non SUMOylée induit l'expression du gène endogène ICAM-1, via l'activation de la voie NF- κ B, au même niveau qu'une protéine Tax sauvage. Considérées avec nos expériences de transactivation précédentes, ces données fournissent la preuve que la SUMOylation de Tax n'est pas nécessaire pour que cette protéine active les promoteurs de gène dépendant de la voie NF- κ B dans les cellules adhérentes.

A.



B.

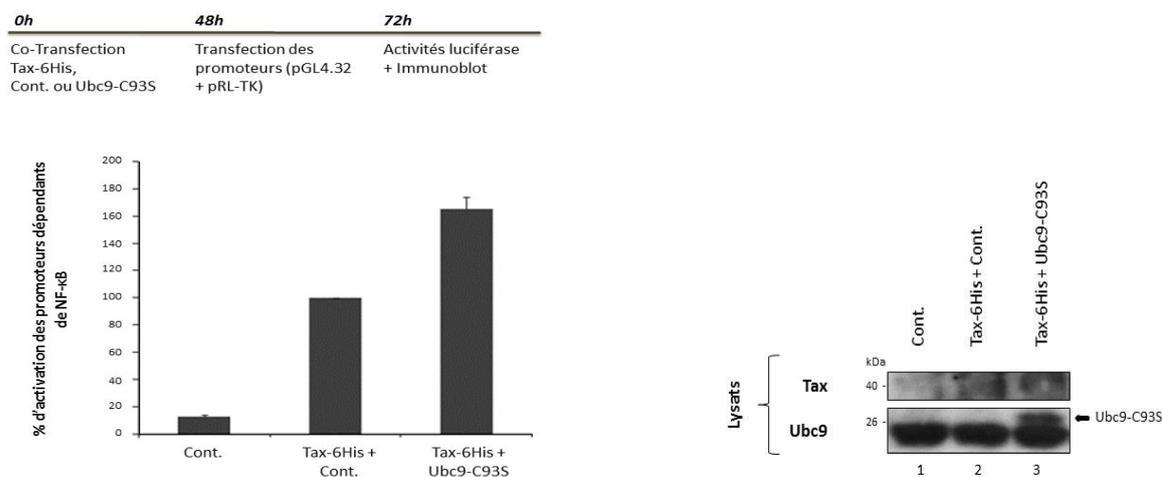


FIGURE 58 : Une protéine Tax non SUMOylée active des promoteurs à éléments de réponse κB transfectés dans les cellules T.

- A.** Des cellules T MOLT4 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 2 à 5) et avec, soit la construction HA-SUMO-3 (pistes 2 et 3), soit la construction HA-Ub (pistes 4 et 5), associées au mutant T7-Ubc9-C93S (pistes 3 et 5) ou à un plasmide pSG5m contrôle (pistes 2 et 4). 48 heures après, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression des protéines Tax et Ubc9 (lysats) et l'autre a été purifiée avec des billes de nickel afin d'isoler la protéine Tax-6His. Les protéines Tax purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-HA puis avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantité de protéines Tax SUMOylées ou ubiquitinylées a été mesurée puis normalisée sur celle des protéines Tax non conjuguées ($(Tax-HA-SUMO-3)/Tax$, ou $(Tax-HA-Ub)/Tax$). Le pourcentage de formes modifiées de Tax en présence d'Ubc9-C93S a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines Tax seules (fixé à 100%).
- B.** Des cellules MOLT4 ont été co-transfectées avec un plasmide Tax-6His associé au mutant T7-Ubc9-C93S ou à un plasmide pSG5m contrôle. 48h après, les cellules ont été soumises à une deuxième série de transfection avec la construction pGL4.32 (κB -Luc2P) et le plasmide pRL-TK permettant la normalisation des activités Firefly. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. En parallèle, l'expression des protéines Tax et Ubc9 a été analysée par immunoblot (lysats). Les pourcentages représentés sur le graphique correspondent aux ratios « activité Firefly/activité Renilla » normalisés par ceux obtenus pour la protéine Tax seule (fixés à 100%). Ils représentent les moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes, réalisées en double.

I.4. Une protéine Tax non SUMOylée active la transcription dépendante de NF- κ B dans les cellules T

Après avoir étudié l'importance de la SUMOylation de Tax dans des lignées cellulaires HEK 293T, nous avons confirmé nos résultats dans des lymphocytes T car, comme cela a été expliqué dans l'introduction, ces cellules sont les cibles préférentiellement infectées par le virus HTLV-1 *in vivo* (Richardson et al., 1990). Nous avons choisi d'employer des lignées de lymphocytes T MOLT4, issues d'un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique (Minowada et al., 1972) (**FIGURE 58**). Nous avons commencé par vérifier l'inhibition de la SUMOylation de la protéine Tax lors du blocage de l'enzyme Ubc9 dans ces cellules MOLT4, en réalisant des purifications de Tax sur billes de nickel (**FIGURE 58A**). Malgré l'optimisation du protocole de transfection, la SUMOylation endogène de Tax n'est pas détectable dans les lignées cellulaires MOLT4, en raison de la moins bonne efficacité de transfection des cellules T par rapport aux cellules adhérentes. Nous avons donc transfecté les cellules MOLT4 avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His ainsi qu'avec une construction HA-SUMO-3 ou HA-Ub (utilisée comme contrôle) (Nasr, 2006), en présence ou non du mutant Ubc9-C93S. Les protéines SUMO-3 et ubiquitine transfectées nous ont permis de visualiser distinctement les modifications post-traductionnelles de Tax dans les lymphocytes T. 48h après, les cellules ont été lysées et les protéines Tax-6His ont été purifiées sur billes de nickel puis leurs modifications post-traductionnelles ont été étudiées par immunoblot avec un anticorps anti-HA. Les signaux mesurés pour les modifications de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour Tax seule ont été fixées à 100%.

Des formes de Tax conjuguées à des protéines HA-SUMO-3 ou HA-Ub sont purifiées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURE 58A**, pistes 2 et 4) mais pas avec le vecteur contrôle (**FIGURE 58A**, piste 1), validant nos expériences.

En présence d'Ubc9-C93S, la SUMOylation de Tax avec des protéines HA-SUMO-3 est fortement diminuée par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURE 58A**, pistes 2 et 3) pour atteindre un niveau d'expression nul, comparable à celui du bruit de fond.

L'expression de la protéine Tax non conjuguée n'est pas réduite en présence d'Ubc9-C93S, indiquant que la baisse de la SUMOylation de Tax n'est pas due à une diminution de l'expression de la protéine. L'ubiquitylation de Tax reste également quasi identique, avec ou sans le mutant Ubc9-C93S (**FIGURE 58A**, pistes 4 et 5), ce qui prouve l'inhibition spécifique de la SUMOylation de Tax induite par ce mutant dans les cellules T.

Le blocage de l'enzyme Ubc9 endogène est validé par l'importante expression du mutant Ubc9-C93S au niveau des lysats cellulaires (**FIGURE 58A**, lysats, pistes 3 et 5).

Avec ces expériences de purification dans les lymphocytes T MOLT4, nous constatons que le blocage de l'activité d'Ubc9 inhibe la SUMOylation endogène de Tax comme dans les cellules adhérentes HEK 293T, nous permettant de produire une protéine Tax non SUMOylée, sans modifications de son niveau d'ubiquitylation.

Nous avons également réalisé dans les cellules MOLT4 des expériences de purification de Tax en bloquant l'expression d'Ubc9 grâce à des siARN spécifiques, comme dans la **FIGURE 53B**. Toutefois, dans ces cellules T, seule une inhibition partielle de la conjugaison de Tax aux protéines HA-SUMO-3 est obtenue avec les siUbc9 (environ 30% contre plus de 80% dans les cellules HEK 293T de la **FIGURE 53B**). L'inhibition de la SUMOylation de Tax avec le mutant Ubc9-C93S étant complète, comme dans les cellules HEK 293T (**FIGURE 53A**), nous avons choisi de ne pas utiliser les siUbc9 mais uniquement ce mutant d'Ubc9 pour bloquer l'enzyme endogène dans les lignées cellulaires MOLT4, lors de la suite de nos analyses.

Après avoir validé notre stratégie d'inhibition dans les cellules T, nous avons étudié la capacité d'une protéine Tax non SUMOylée à activer un promoteur transfecté dépendant de NF- κ B dans ces lignées MOLT4. Pour cela, nous avons eu recours à des expériences de transactivation de promoteur (**FIGURE 58B**). Des cellules MOLT4 ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec la construction codant pour la protéine Ubc9 mutée (Ubc9-C93S) ou avec un plasmide pSG5m contrôle (Cont.). 48h après, les cellules ont été transfectées une deuxième fois avec le promoteur pGL4.32, contenant des éléments de réponse κ B, et avec le promoteur pRL-TK. Comme dans la **FIGURE 55**, ce protocole permet d'inhiber la SUMOylation endogène de Tax avant la transfection des promoteurs. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. L'activité de la protéine Tax transfectée avec le plasmide contrôle a été arbitrairement fixée à 100%. En parallèle, l'expression des protéines Tax et Ubc9 ont été analysées par immunoblot (**FIGURE 58B**, lysats).

De la même façon que pour la **FIGURE 55**, en l'absence de Tax le niveau basal d'activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B est faible dans les cellules T. La présence de la protéine Tax augmente significativement la transcription dépendante de NF- κ B, confirmant l'activation spécifique des promoteurs à éléments de réponse κ B par Tax (**FIGURE 58B**).

En présence d'Ubc9-C93S, le pourcentage d'activation des promoteurs dépendants de NF- κ B n'est pas diminué mais au contraire augmenté, par rapport à celui obtenu pour la protéine Tax seule (**FIGURE 58B**).

Au niveau des lysats cellulaires, l'expression du mutant Ubc9-C93S confirme le blocage de l'enzyme endogène dans les cellules MOLT4 (**FIGURE 58B**, lysats, piste 3).

Ces résultats de transactivation dans les lymphocytes T sont identiques à ceux obtenus précédemment dans les cellules HEK 293T, démontrant qu'une protéine Tax non SUMOylée active la transcription dépendante de la voie NF- κ B comme une protéine Tax sauvage, que ce soit dans des cellules adhérentes ou dans des cellules T, cibles de l'infection par le virus HTLV-1 *in vivo*.

L'ensemble de nos analyses, concernant l'importance de la SUMOylation de Tax dans le cadre de l'activation de la voie NF- κ B induite par cette protéine, valide les conclusions de notre étude précédente (Bonnet et al., 2012) et écarte les oppositions soulevées par différentes équipes, sur le fait qu'un faible niveau de SUMOylation de Tax serait suffisant et indispensable pour que cette protéine active la voie NF- κ B (Shirinian et al., 2013; Turci et al., 2012; Zane and Jeang, 2012). En effet, grâce à une nouvelle stratégie permettant d'inhiber la machinerie de SUMOylation endogène dans les cellules adhérentes comme dans les cellules T, nous avons prouvé qu'une protéine Tax non SUMOylée, mais toujours ubiquitinylée, active la transcription à partir de promoteurs dépendants de NF- κ B, qu'ils soient transfectés ou intégrés stablement dans la chromatine cellulaire, mais également à partir de promoteurs endogènes situés en amont de gènes cibles de la voie NF- κ B.

Ces résultats, qui ont été publiés en Septembre dernier dans *Journal of Virology* (**ANNEXE 1**) (Pène et al., 2014), établissent la preuve formelle que la SUMOylation de Tax n'est pas essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B, clarifiant ainsi le débat qui avait lieu ces dernières années autour du rôle de cette modification post-traductionnelle dans l'induction de la voie NF- κ B par la protéine Tax.

II. LA PROTÉINE TRAF5 : NOUVEAU RÔLE DANS L'UBIQUITINYLATION DE TAX ET DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

L'ubiquitinylation de Tax est un événement essentiel pour l'activation de la voie NF- κ B contrairement à ce que nous avons montré pour sa SUMOylation. En effet, notre laboratoire ainsi que d'autres équipes ont prouvé que la conjugaison de Tax à des chaînes d'ubiquitine liées en K63, était nécessaire pour que Tax interagisse avec NEMO et recrute l'ensemble du complexe IKK au niveau d'un compartiment périnucléaire, pour induire ensuite l'activation de ce complexe (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Shibata et al., 2011).

De nombreuses interrogations persistent autour de l'association de Tax au complexe NEMO/IKK α /IKK β , qui constitue l'élément central de l'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax (Chu et al., 1998). L'une des questions majeures concerne l'identification de l'enzyme E3 ligase impliquée dans l'ubiquitinylation K63 de Tax, qui reste à ce jour inconnue. Parmi les potentielles E3 évoquées, les protéines de la famille TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*) semblent être des candidates intéressantes, et particulièrement la protéine TRAF5, qui a été décrite comme impliquée dans l'activation du complexe IKK induite par l'oncoprotéine LMP1 du virus EBV (Devergne et al., 1998; Kraus et al., 2009).

Nous avons donc décidé d'étudier le rôle de TRAF5 dans l'ubiquitinylation de Tax ainsi que dans la formation du complexe Tax/IKK, indispensable à l'activation de la voie NF- κ B.

Pour notre étude, nous avons employé une stratégie basée sur le blocage de l'enzyme TRAF5, permettant d'analyser de façon précise le rôle de cette protéine. Nous avons choisi soit de bloquer l'expression de la protéine TRAF5 endogène en utilisant des siARN spécifiques, soit de bloquer son activité endogène, en employant le mutant catalytiquement inactif TRAF5 DN, dont le domaine RING et les motifs à doigt de zinc, nécessaires à la fonction d'ubiquitine ligase, ont été éliminés (Wong et al., 1998).

Ces études nous ont permis de disséquer les étapes de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax ainsi que l'implication de l'ubiquitinylation de Tax dans ce mécanisme.

II.1. TRAF5 contribue à l'ubiquitylation de la protéine Tax, indépendamment de son activité ligase

Nous avons commencé par étudier l'implication de l'enzyme TRAF5 dans l'ubiquitylation de Tax afin de déterminer si TRAF5 était sa potentielle E3 ligase. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de purification de Tax sur billes de nickel permettant d'analyser l'ubiquitylation de cette protéine lors du blocage de TRAF5 (**FIGURE 59**). Nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec le plasmide Tax-6His associé aux siARN TRAF5 (siTRAF5) ou à des siARN contrôles (siCont.), afin de bloquer l'expression de l'enzyme TRAF5 endogène. Ces siARN et leur efficacité ont été décrits dans (Tang and Wang, 2010). 48h après, la protéine Tax a été purifiée sur billes de nickel et son ubiquitylation endogène a été détectée par immunoblot avec un anticorps anti-Ub-totale (P4D1+Fk2), permettant de visualiser tous les types de chaînes d'ubiquitine fixées à Tax (liées en K63, K48, K11,...), et avec un anticorps anti-Ub-K63 décelant spécifiquement les chaînes endogènes d'ubiquitine liées en K63 à Tax, qui sont essentielles à l'activation de la voie NF- κ B (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Shibata et al., 2011). Les signaux mesurés pour les modifications de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100%.

Des formes de Tax conjuguées à des chaînes d'ubiquitine K63 ou à des chaînes d'ubiquitine totale, sont purifiées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURE 59**, piste 3) mais pas avec le plasmide Tax codant pour une protéine non étiquetée (**FIGURE 59**, piste 2) ou avec le vecteur contrôle (**FIGURE 59**, piste 1). Les billes de nickel ont donc fixé spécifiquement les protéines avec l'étiquette 6His, validant nos expériences. Par ailleurs, comme dans les purifications précédentes réalisées dans le cadre de notre étude sur la SUMOylation de Tax, des bandes de poids moléculaires supérieurs à 40kDa (Tax non conjuguée) sont détectées avec les anticorps spécifiques des ubiquitylations, qui correspondent aux formes mono et polyubiquitylées de Tax.

En présence des siARN TRAF5, la conjugaison de Tax à des chaînes endogènes d'ubiquitine liées en K63 est fortement diminuée par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 59**, pistes 4 et 5) ou à Tax seule (**FIGURE 59**, piste 3). L'ubiquitylation totale de Tax est également réduite de façon importante avec les siTRAF5. En revanche, l'expression de la protéine Tax non conjuguée reste inchangée avec les siARN TRAF5, indiquant que la baisse d'ubiquitylation de Tax n'est pas due à une diminution de l'expression de la protéine (**FIGURE 59**, piste 5).

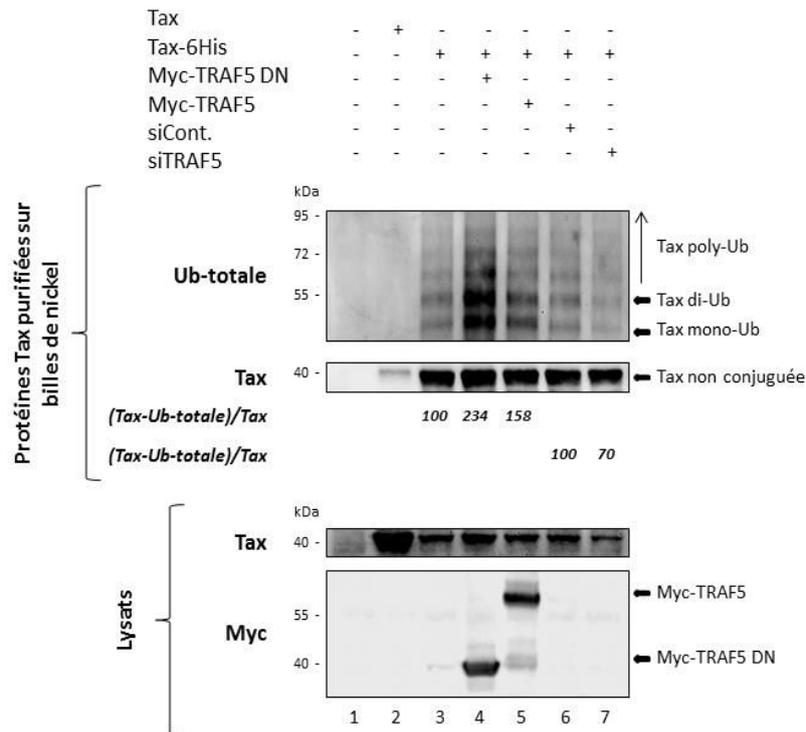


FIGURE 60 : L'activité ligase de la protéine TRAF5 n'est pas impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 3 à 7) et avec, soit des constructions codant pour le mutant Myc-TRAF5 DN (piste 4) ou pour la protéine sauvage Myc-TRAF5 (piste 5), soit des siARN TRAF5 (piste 7) ou des siARN contrôles (piste 6). 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression de la protéine Tax ainsi que celle des protéines TRAF5 DN et TRAF5 (lysats). L'autre partie a été purifiée avec des billes de nickel afin d'isoler la protéine Tax-6His. Les protéines Tax purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-Ub-totale (P4D1 + Fk2) puis avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantité de protéines Tax ubiquitinylées a été mesurée puis normalisée sur celle des protéines Tax non conjuguées ((Tax-Ub-totale)/Tax). Le pourcentage de formes modifiées de Tax en présence de TRAF5 DN ou de TRAF5 a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines Tax seules (fixé à 100%), tandis que le pourcentage de Tax ubiquitinylées avec les siTRAF5 a été calculé en fonction de celui obtenu pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixé à 100%).

Ces expériences de purification démontrent que le blocage de l'expression de la protéine TRAF5 endogène diminue fortement mais pas complètement l'ubiquitinylation de Tax, et notamment sa conjugaison à des chaînes d'ubiquitine liées en K63, connues comme étant impliquées dans le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax.

TRAF5 participe donc à l'ubiquitinylation de Tax mais ne semble pas être la seule et unique E3 ligase impliquée dans ce processus.

Pour continuer notre étude, nous avons voulu déterminer si la protéine TRAF5 induisait directement l'ubiquitinylation de Tax grâce à son activité ligase. Pour cela, nous avons eu recours à des expériences de purification de Tax sur billes de nickel en présence d'un mutant TRAF5 DN, dans lequel le domaine RING ainsi que les motifs à doigt de zinc de sa partie N-terminale ont été enlevés, le rendant catalytiquement inactif (Wong et al., 1998) (**FIGURE 60**). TRAF5 fonctionnant en homo ou hétérodimères, ce mutant permet de bloquer l'activité des protéines TRAF5 endogènes, en interagissant avec ces protéines ainsi qu'avec leurs partenaires cellulaires, via son domaine TRAF caractéristique en C-terminal (Wong et al., 1998). Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec le plasmide Tax-6His et avec, soit les constructions codant pour le mutant TRAF5 DN (Myc-TRAF5 DN) ou pour la protéine TRAF5 sauvage (Myc-TRAF5) utilisée comme contrôle, soit les siARN TRAF5 (siTRAF5) ou des siARN contrôles (siCont.) afin de comparer les effets du blocage de l'activité ou de l'expression de TRAF5 sur l'ubiquitinylation de Tax. Après 48h, les cellules ont été lysées et les protéines Tax-6His ont été purifiées sur billes de nickel. Les modifications post-traductionnelles de Tax avec des chaînes d'ubiquitine totale ont ensuite été étudiées par immunoblot. Les signaux mesurés pour les modifications de Tax ont été normalisés sur les signaux de la protéine Tax non conjuguée et les valeurs obtenues pour Tax seule ou Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100%.

Des formes de Tax conjuguées à des chaînes d'ubiquitine totale sont purifiées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURE 60**, piste 3) mais pas avec le plasmide Tax codant pour une protéine non étiquetée (**FIGURE 60**, piste 2) ou avec le vecteur contrôle (**FIGURE 60**, piste 1), validant nos expériences.

En présence du mutant TRAF5 DN, l'ubiquitinylation totale de Tax n'est pas diminuée, mais au contraire augmentée par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURE 60**, pistes 3 et 4). La conjugaison de Tax aux ubiquitines est également plus importante avec la protéine TRAF5 sauvage comparée à Tax seule (**FIGURE 60**, pistes 3 et 5), confortant l'implication de TRAF5 dans le processus d'ubiquitinylation de Tax.

Comme dans la **FIGURE 59**, les ubiquitines conjuguées à Tax sont réduites avec les siARN TRAF5 par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 60**, pistes 6 et 7), ce qui participe à la validation du rôle de TRAF5 dans le mécanisme d'ubiquitylation de la protéine Tax. Par ailleurs, l'expression de Tax non conjuguée reste identique en présence du mutant TRAF5 DN ou des siTRAF5, confirmant que les modifications d'ubiquitylation de Tax ne sont pas liées à une variation de l'expression de la protéine (**FIGURE 60**, pistes 4 et 7).

Au niveau des lysats cellulaires, la forte expression du mutant TRAF5 DN garantit le blocage catalytique de l'enzyme TRAF5 endogène (**FIGURE 60**, lysats, piste 4).

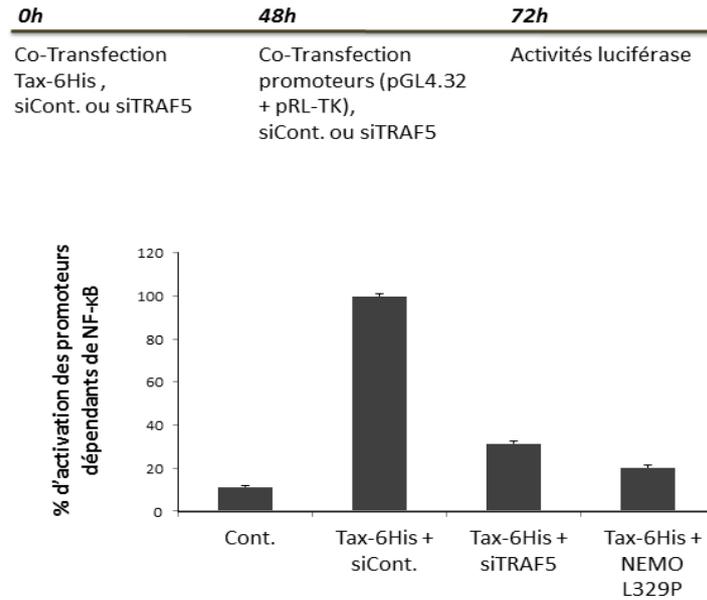
Ces expériences avec le mutant TRAF5 DN, dans lequel le domaine RING et les motifs à doigt de zinc qui sont des structures nécessaires à l'activité des enzymes ubiquitine ligase (Joazeiro and Weissman, 2000) sont absents, démontrent que TRAF5 n'est pas l'enzyme E3 ligase qui conjugue directement les chaînes d'ubiquitine sur la protéine Tax, même si elle est bien impliquée dans ce processus.

En résumé, les différents résultats que nous avons obtenus prouvent que la protéine TRAF5 est nécessaire pour induire une partie de l'ubiquitylation de Tax, notamment avec des chaînes K63. Toutefois, nous avons montré que cette protéine agit indépendamment de son activité ligase sur le processus de conjugaison de Tax aux ubiquitines. Ce mécanisme suggère donc le recrutement d'une deuxième enzyme E3 ligase par TRAF5, qui serait directement responsable d'une partie de l'ubiquitylation de Tax.

II.2. TRAF5 est impliquée dans l'activation de la transcription dépendante de NF- κ B, indépendamment de son activité ligase

Suite à nos résultats démontrant l'implication de la protéine TRAF5 dans l'ubiquitylation de Tax, nous avons voulu déterminer si TRAF5 contribuait également à l'activation de la voie NF- κ B, pour laquelle l'ubiquitylation de Tax constitue un événement essentiel (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). Pour cela, nous avons effectué des expériences de transactivation de promoteur associé à des gènes rapporteurs luciférase (**FIGURE 61**). Nous avons d'abord co-transfecté des cellules HEK 293T avec un plasmide codant pour Tax-6His et avec, soit les siARN TRAF5 ou des siARN contrôles (siCont.) (**FIGURE 61A**), soit les constructions codant pour le mutant TRAF5 DN (Myc-TRAF5 DN) ou pour la protéine TRAF5 sauvage (Myc-TRAF5) (**FIGURE 61B**).

A.



B.



FIGURE 61 : La protéine TRAF5 contribue à l'activation de promoteur à éléments de réponse κB par Tax, indépendamment de son activité ligase.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His et avec, (**A.**) soit des siARN TRAF5 ou des siARN contrôles, (**B.**) soit des constructions codant pour le mutant Myc-TRAF5 DN ou pour la protéine sauvage Myc-TRAF5. 48h après, les cellules ont été soumises à une deuxième série de transfection avec la construction pGL4.32 (κB-Luc2P) et le plasmide pRL-TK permettant la normalisation des activités Firefly associés, (**A.**) soit aux siTRAF5 ou aux siARN contrôles, (**B.**) soit au mutant Myc-TRAF5 DN. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée. Les pourcentages représentés sur les graphiques correspondent aux ratios « activité Firefly/activité Renilla » normalisés par ceux obtenus pour la protéine Tax seule ou avec les siARN contrôles (fixés à 100%). Ils représentent les moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes, réalisées en double.

Après 48h, les cellules ont été transfectées une deuxième fois avec le promoteur pGL4.32, comprenant des éléments de réponse κ B, et avec le promoteur pRL-TK, constitutivement exprimé. Ces promoteurs ont été co-transfectés avec une nouvelle fois, dans la **FIGURE 61A** les siTRAF5 ou des siARN contrôles, et dans la **FIGURE 61B** le mutant TRAF5 DN. Ce protocole permet de s'assurer de l'inhibition efficace de l'enzyme TRAF5 endogène au moment où les promoteurs sont transfectés et où la protéine Tax peut les activer. Après 24h de culture supplémentaire, les cellules ont été lysées, puis les activités luciférase ont été mesurées. Les activités de la protéine Tax, exprimée seule ou avec les siARN contrôles, ont été arbitrairement fixées à 100%.

De la même manière que lors des expériences de transactivation précédentes, l'activation basale des promoteurs dépendants de NF- κ B dans les cellules HEK 293T est faible. En revanche, en présence de la protéine Tax, la transcription induite à partir de ces promoteurs est fortement augmentée, indiquant leur activation spécifique par Tax (**FIGURES 61A et 61B**). Pour valider nos expériences, un mutant de NEMO (NEMO L329P) a été employé comme contrôle négatif car il a été décrit comme étant incapable d'activer la voie NF- κ B cellulaire (Wu et al., 2006). En effet, ce mutant ne peut plus se lier aux chaînes d'ubiquitine, ce qui empêche donc son recrutement au niveau des protéines ubiquitinylées impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B. Comme attendu, en présence de ce mutant, le pourcentage d'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B est extrêmement bas, proche du niveau basal d'activation détecté dans les cellules HEK 293T (**FIGURES 61A et 61B**).

En présence des siARN TRAF5, la transcription dépendante de NF- κ B est significativement réduite par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 61A**). De façon intéressante, cette baisse semble comparable à celle obtenue pour l'ubiquitinylation de Tax lors du blocage de l'expression de la protéine TRAF5 endogène (**FIGURE 59**).

Avec le mutant TRAF5 DN, le pourcentage d'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B n'est pas diminué, mais au contraire augmenté, par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURE 61B**). De la même façon, une augmentation de la conjugaison de Tax aux ubiquitines a été observée en présence de TRAF5 DN, dans le cadre des expériences de purification de Tax sur billes de nickel (**FIGURE 60**).

Par ailleurs, la protéine TRAF5 sauvage active également de façon plus importante la transcription dépendante de NF- κ B par rapport à Tax seule (**FIGURE 61B**), ce qui confirme l'implication de TRAF5 dans l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax.

Ces analyses démontrent que TRAF5, indépendamment de son activité ligase, participe aux mécanismes déclenchés par la protéine Tax pour activer la voie NF- κ B dans les cellules adhérentes. D'autre part, le blocage de l'enzyme TRAF5 endogène dans ces expériences de transactivation semble conduire à des effets similaires à ceux décrits dans les expériences de purification de Tax précédentes. Le lien entre ubiquitinylation de Tax et activation de la voie NF- κ B ayant été clairement établi, nous pouvons donc en déduire que l'impact de TRAF5 sur l'activation de la voie NF- κ B est corrélé à son implication dans l'ubiquitinylation de Tax, confortant ainsi l'importance de la protéine TRAF5 dans ces processus.

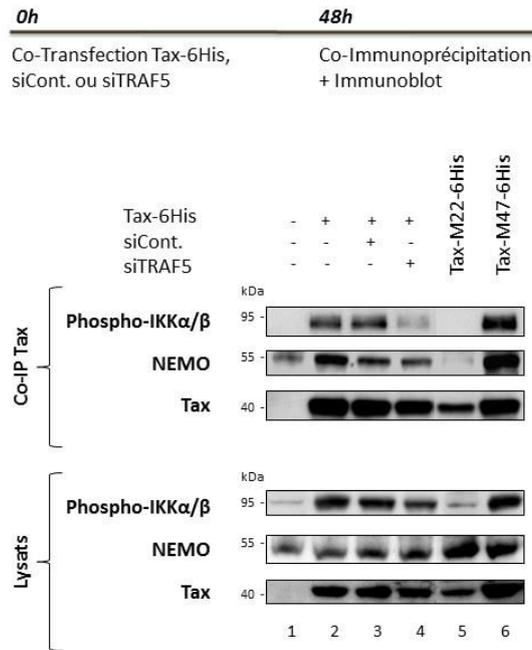
II.3. TRAF5 induit la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , indépendamment de son activité ligase

Pour analyser plus en détail le rôle de TRAF5 dans les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B induits par la protéine Tax ubiquitinylée, nous avons étudié l'implication de TRAF5 dans le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax. En effet, cet événement a été démontré comme étant central dans l'activation de la voie NF- κ B (Chu et al., 1998) et déclenché par l'ubiquitinylation de la protéine Tax (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006). Nous avons donc réalisé des expériences de co-immunoprécipitation de Tax lors du blocage de l'expression ou de l'activité de la protéine TRAF5 endogène, afin d'observer l'impact de TRAF5 sur l'association entre Tax et les protéines NEMO, IKK α et IKK β , constituant le complexe IKK (**FIGURES 62, 63, 64 et 65**).

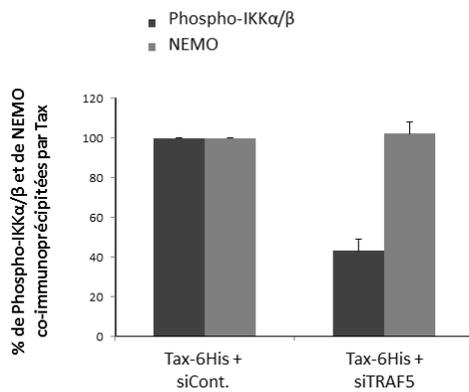
II.3.1. Analyse du recrutement et de l'activation du complexe IKK par Tax lors du blocage de l'expression de TRAF5

Nous avons commencé par co-transfecter des cellules HEK 293T avec le plasmide Tax-6His et avec, soit les siARN TRAF5, soit des siARN contrôles (siCont.), afin de bloquer l'expression de l'enzyme TRAF5 endogène (**FIGURE 62**). 48h après, les cellules ont été lysées puis la protéine Tax a été co-immunoprécipitée avec ses partenaires protéiques endogènes, grâce à un anticorps monoclonal anti-Tax. Les protéines associées ont ensuite été identifiées par immunoblot avec un anticorps anti-Phospho-IKK α/β , détectant à la fois les formes phosphorylées d'IKK α et d'IKK β , et avec un anticorps anti-NEMO (**FIGURE 62A**).

A.



B.



C.

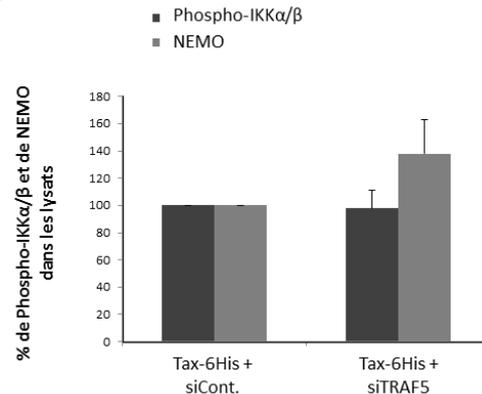


FIGURE 62 : Contrairement à l'association Tax/NEMO, le recrutement des formes phosphorylées d'IKKα et β par Tax nécessite la protéine TRAF5.

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec (A.), soit un plasmide pSG5m contrôle (piste 1), soit un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 2 à 4) associé à des siARN TRAF5 (piste 4) ou à des siARN contrôles (piste 3). Les constructions codant pour les mutants Tax-M22-6His (piste 5) et Tax-M47-6His (piste 6) ont également été transfectées pour servir de contrôles négatifs ou positifs. 48 heures après, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression endogène des protéines du complexe IKK ainsi que celle de la protéine Tax (lysats). Dans l'autre partie, Tax a été co-immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal anti-Tax afin d'identifier ses partenaires protéiques (Co-IP Tax). Les protéines co-immunoprécipitées ont ensuite été analysées par immunoblot avec les anticorps anti-Phospho-IKKα/β et anti-NEMO, ainsi qu'avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). Les quantités de protéines Phospho-IKKα/β ou NEMO mesurées dans les Co-IP ou dans les lysats ont été normalisées sur celles des protéines Tax. Les pourcentages représentés sur le graphique B. correspondent aux moyennes des quantités normalisées de protéines Phospho-IKKα/β ou NEMO qui ont été co-immunoprécipitées par Tax dans trois expériences indépendantes. Les pourcentages du graphique C. représentent les moyennes des expressions de ces protéines, mesurées dans les lysats cellulaires de ces trois mêmes expériences. (B. et C.) Les pourcentages de co-immunoprécipitation et d'expression déterminés avec les siTRAF5 ont été calculés en fonction de ceux obtenus pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixés à 100%).

Les moyennes des signaux obtenus pour les protéines Phospho-IKK α/β ou NEMO, mesurés lors de trois expériences distinctes, ont été représentées sous forme de graphiques correspondant aux pourcentages de co-immunoprécipitation de ces protéines avec Tax (**FIGURE 62B**), ainsi qu'à leurs niveaux d'expression dans les lysats cellulaires (**FIGURE 62C**). Chaque signal mesuré pour Phospho-IKK α/β ou NEMO a été normalisé sur le signal de la protéine Tax associée et les valeurs obtenues pour Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100% (**FIGURES 62B et 62C**).

Au niveau des co-immunoprécipitations, aucune protéine Tax n'est détectée lorsque les cellules ont été transfectées avec le vecteur contrôle (**FIGURE 62A**, piste 1), confirmant la spécificité de l'anticorps monoclonal employé pour récupérer Tax. Par ailleurs, des protéines IKK α et IKK β phosphorylées sont co-immunoprécipitées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURE 62A**, piste 2) mais pas avec le vecteur contrôle (**FIGURE 62A**, piste 1). De la même façon, la protéine NEMO endogène est fortement précipitée avec Tax-6His (**FIGURE 62A**, piste 2) alors que seule une faible bande aspécifique est détectée avec le plasmide contrôle (**FIGURE 62A**, piste 1). Ces résultats permettent de valider nos expériences car ils montrent les interactions spécifiques de Tax avec NEMO et avec les formes activées par phosphorylation d'IKK α et d'IKK β , qui caractérisent le recrutement et l'activation du complexe IKK par la protéine Tax (Harhaj and Sun, 1999).

En parallèle, nous avons utilisé les mutants Tax-M22-6His et Tax-M47-6His comme contrôles négatifs ou positifs du recrutement et de l'activation du complexe IKK par Tax.

Le mutant Tax-M22 a en effet été décrit comme ne pouvant interagir avec la protéine NEMO (Harhaj and Sun, 1999), l'empêchant ainsi d'induire la phosphorylation du complexe IKK (Geleziunas et al., 1998; Yin et al., 1998) et par conséquent, d'activer l'ensemble de la voie NF- κ B (Smith and Greene, 1990). A l'inverse, le mutant Tax-M47 est capable de se lier à NEMO (Harhaj and Sun, 1999) et d'induire l'activation d'IKK (Chu et al., 1998; Yin et al., 1998), entraînant alors celle de la voie NF- κ B, de la même façon qu'une protéine Tax sauvage (Smith and Greene, 1990). Comme attendu, en présence du mutant Tax-M22-6His, la protéine NEMO endogène n'est pas co-immunoprécipitée (**FIGURE 62A**, piste 5) alors qu'elle l'est nettement avec Tax sauvage (**FIGURE 62A**, piste 2). Nous remarquons également l'absence de Phospho-IKK α/β endogènes associées à Tax-M22-6His (**FIGURE 62A**, piste 5), confirmant son incapacité à lier et à activer le complexe IKK. Avec le mutant Tax-M47-6His, NEMO est fortement précipitée tout comme les formes actives des sous-unités catalytiques du complexe IKK (**FIGURE 62A**, piste 6). Ces mutants de Tax apportent donc une validation complète de nos expériences.

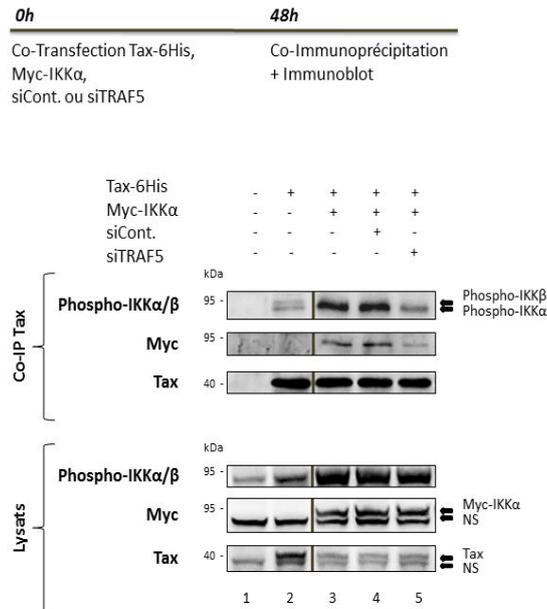
En présence des siTRAF5, le pourcentage de protéines Phospho-IKK α/β co-immunoprécipitées avec Tax-6His est significativement réduit (environ 60%, **FIGURE 62B**) alors que la quantité de NEMO associées à Tax-6His reste inchangée par rapport aux siARN contrôles (**FIGURES 62B et 62A**, pistes 3 et 4).

Au niveau des lysats cellulaires, l'expression des protéines IKK α et IKK β phosphorylées ne varie quasiment pas entre les siTRAF5 et les siARN contrôles (**FIGURE 62C**), tout comme l'expression de NEMO (**FIGURES 62C et 62A**, lysats, pistes 3 et 4). La protéine TRAF5 ne semble donc pas impliquée dans la phosphorylation des sous-unités catalytiques du complexe IKK induite par Tax.

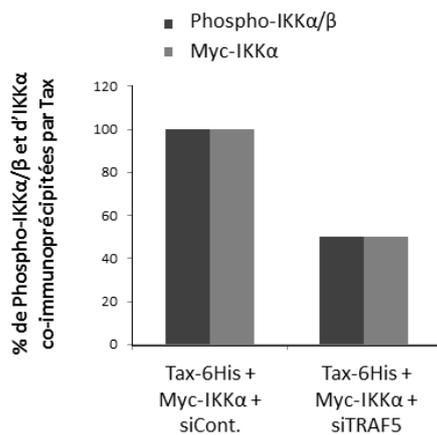
L'ensemble de ces résultats permet pour la première fois de mettre en évidence un mécanisme séquentiel de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax, avec d'une part la formation du complexe Tax/NEMO qui est indépendante de la protéine TRAF5 et d'autre part, le recrutement par Tax des sous-unités IKK α et IKK β phosphorylées qui, à l'inverse, est favorisé par TRAF5. Nous avons également constaté que TRAF5 n'induisait pas l'activation d'IKK α et β par phosphorylation dans les cellules, mais principalement leur association avec la protéine Tax.

Pour compléter nos analyses, nous avons étudié l'implication de TRAF5 dans les interactions entre Tax et chacune des sous-unités catalytiques du complexe IKK. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec des constructions codant pour une protéine Myc-IKK α (**FIGURE 63**) ou pour une protéine VSV-G-IKK β (**FIGURE 64**). Les cellules ont également été co-transfectées avec le plasmide Tax-6His et avec, soit les siARN TRAF5, soit des siARN contrôles (siCont.). 48 après, les cellules ont été lysées puis la protéine Tax a été co-immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal anti-Tax. Les sous-unités IKK α et IKK β associées à Tax, ainsi que leurs formes phosphorylées, ont été identifiées par immunoblot avec des anticorps anti-Myc (**FIGURE 63**), anti-VSV-G (**FIGURE 64**) ou anti-Phospho-IKK α/β (**FIGURES 63 et 64**). Comme précédemment, les pourcentages de co-immunoprécipitation de ces protéines avec Tax ont été représentés sous forme de graphiques (**FIGURES 63B et 64B**), ainsi que leurs niveaux d'expression dans les lysats cellulaires (**FIGURES 63C et 64C**). Chaque signal mesuré pour Myc-IKK α , VSV-G-IKK β ou Phospho-IKK α/β a été normalisé sur le signal de la protéine Tax associée et les valeurs obtenues pour Tax transfectée avec les siARN contrôles ont été fixées à 100% (**FIGURES 63B, 63C et 64B, 64C**).

A.



B.



C.

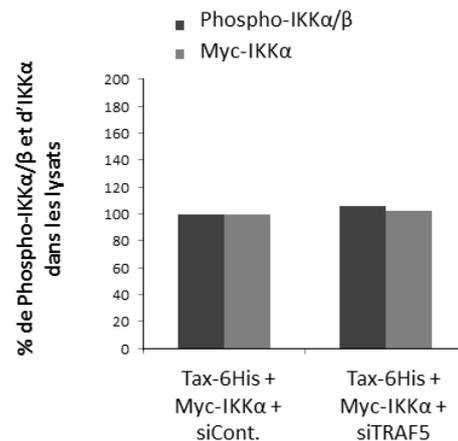


FIGURE 63 : La protéine TRAF5 est impliquée dans le recrutement d'IKK α par Tax mais pas dans sa phosphorylation.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec (A.), soit un plasmide pSG5m contrôle (piste 1), soit un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 2 à 5) associé à une construction Myc-IKK α (pistes 3 à 5) ainsi qu'à des siARN TRAF5 (piste 5) ou à des siARN contrôles (piste 4). 48 heures après, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression des protéines Phospho-IKK α/β et Myc-IKK α , ainsi que celle de la protéine Tax (lysats). Dans l'autre partie, Tax a été co-immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal anti-Tax (Co-IP Tax). Les protéines co-immunoprécipitées ont ensuite été analysées par immunoblot avec les anticorps anti-Phospho-IKK α/β et anti-Myc, ainsi qu'avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). Les quantités de protéines Phospho-IKK α/β ou Myc-IKK α mesurées dans les Co-IP ou dans les lysats ont été normalisées sur celles des protéines Tax. Les pourcentages représentés sur le graphique **B.** correspondent aux quantités normalisées de protéines Phospho-IKK α/β ou Myc-IKK α qui ont été co-immunoprécipitées par Tax. Les pourcentages du graphique **C.** représentent les expressions de ces protéines, mesurées dans les lysats cellulaires. (**B. et C.**) Les pourcentages de co-immunoprécipitation et d'expression déterminés avec les siTRAF5 ont été calculés en fonction de ceux obtenus pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixés à 100%). (NS = bandes Non Spécifiques).

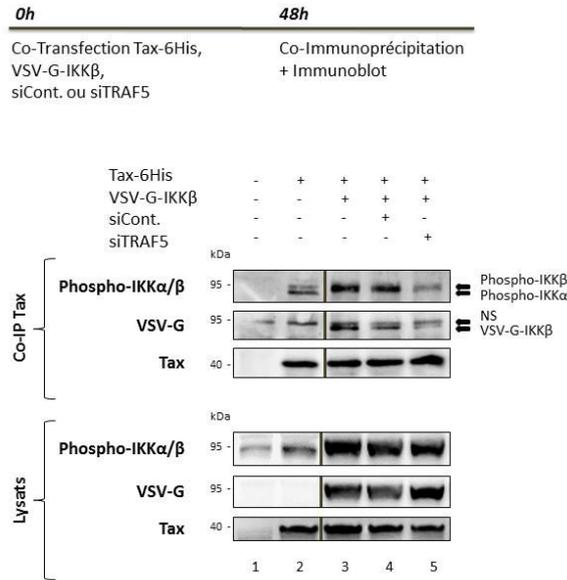
En ce qui concerne les co-immunoprécipitations réalisées avec la protéine Myc-IKK α , nous constatons qu'aucune protéine Tax n'est détectée lorsque les cellules ont été transfectées avec le vecteur contrôle (**FIGURE 63A**, piste 1). De même, Myc-IKK α n'est pas visible dans les cellules transfectées uniquement avec la construction Tax-6His (**FIGURE 63A**, piste 2) ou avec le plasmide contrôle (**FIGURE 63A**, piste 1), validant nos expériences. En revanche, des protéines endogènes IKK α et IKK β phosphorylées sont co-immunoprécipitées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His seule (**FIGURE 63A**, piste 2) mais pas avec le vecteur contrôle (**FIGURE 63A**, piste 1), tandis que de plus grandes quantités de protéines Phospho-IKK α/β sont détectées lorsque la construction Myc-IKK α a été transfectée (**FIGURE 63A**, pistes 3 à 5). Cette augmentation s'explique par la détection conjointe des formes phosphorylées d'IKK α transfectées et des protéines Phospho-IKK α/β endogènes par l'anticorps et confirme ainsi la phosphorylation de la protéine Myc-IKK α dans les cellules. Avec les siARN TRAF5, les pourcentages de protéines Phospho-IKK α/β ou Myc-IKK α co-immunoprécipitées avec Tax-6His sont fortement et identiquement diminués par rapport aux siARN contrôles (environ 50%, **FIGURES 63B** et **63A**, pistes 4 et 5). Cette baisse, comparable à celle observée pour les protéines Phospho-IKK α/β endogènes de la **FIGURE 62B**, prouve que TRAF5 est bien impliquée dans le recrutement par Tax de la sous-unité IKK α , activée ou non par phosphorylation.

Dans les lysats cellulaires, comme dans la **FIGURE 62C**, en présence des siTRAF5 l'expression des protéines Phospho-IKK α/β ou Myc-IKK α reste identique à celles obtenues avec les siARN contrôles (**FIGURES 63C** et **63A**, lysats, pistes 4 et 5).

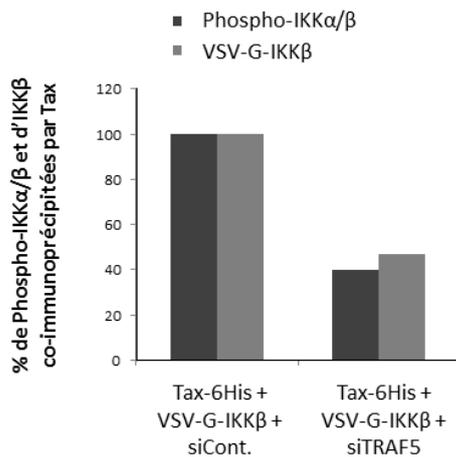
Ce système de co-immunoprécipitation de Tax avec la protéine Myc-IKK α confirme donc nos résultats précédents et prouve que TRAF5 est nécessaire au recrutement de la sous-unité IKK α par Tax, mais pas à son activation par phosphorylation.

Comme pour Myc-IKK α , les expériences de co-immunoprécipitations effectuées avec la protéine VSV-G-IKK β ont été validées par l'absence de Tax et d'IKK β dans les cellules transfectées avec le vecteur contrôle (**FIGURE 64A**, piste 1), ainsi que par l'absence de protéines VSV-G-IKK β avec la construction Tax-6His seule (**FIGURE 64A**, piste 2). De la même façon que dans la **FIGURE 63A**, une plus importante quantité de Phospho-IKK α/β est co-immunoprécipitée en présence de la construction VSV-G-IKK β par rapport à Tax-6His seule (**FIGURE 64A**, pistes 2 et 3 à 5), témoignant de la phosphorylation de cette protéine IKK β transfectée dans les cellules, ainsi que de la capacité de l'anticorps Phospho-IKK α/β à reconnaître à la fois les formes endogènes et les formes phosphorylées d'IKK β transfectées.

A.



B.



C.

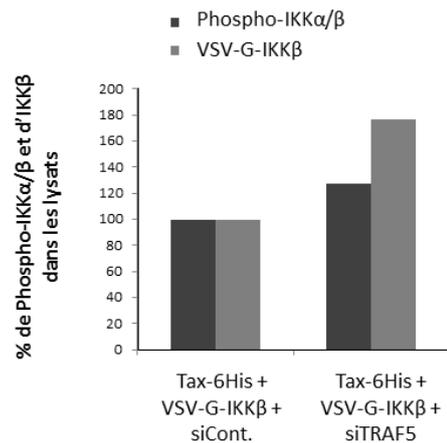


FIGURE 64 : La protéine TRAF5 est impliquée dans le recrutement d'IKK β par Tax mais pas dans sa phosphorylation.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec (A.), soit un plasmide pSG5m contrôle (piste 1), soit un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 2 à 5) associé à une construction VSV-G-IKK β (pistes 3 à 5) ainsi qu'à des siARN TRAF5 (piste 5) ou à des siARN contrôles (piste 4). 48 heures après, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression des protéines Phospho-IKK α/β et VSV-G-IKK β , ainsi que celle de la protéine Tax (lysats). Dans l'autre partie, Tax a été co-immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal anti-Tax (Co-IP Tax). Les protéines co-immunoprécipitées ont ensuite été analysées par immunoblot avec les anticorps anti-Phospho-IKK α/β et anti-VSV-G, ainsi qu'avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax). Les quantités de protéines Phospho-IKK α/β ou VSV-G-IKK β mesurées dans les Co-IP ou dans les lysats ont été normalisées sur celles des protéines Tax. Les pourcentages représentés sur le graphique B. correspondent aux quantités normalisées de protéines Phospho-IKK α/β ou VSV-G-IKK β qui ont été co-immunoprécipitées par Tax. Les pourcentages du graphique C. représentent les expressions de ces protéines, mesurées dans les lysats cellulaires. (B. et C.) Les pourcentages de co-immunoprécipitation et d'expression déterminés avec les siTRAF5 ont été calculés en fonction de ceux obtenus pour les protéines Tax transfectées avec les siARN contrôles (fixés à 100%). (NS = bandes Non Spécifiques).

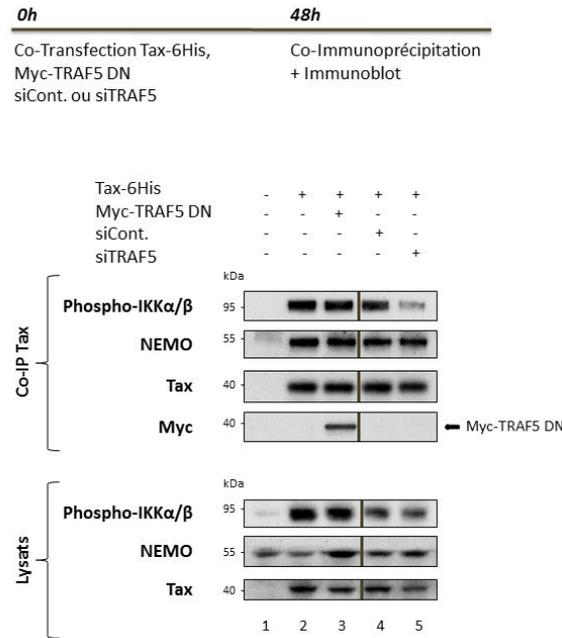
En présence des siTRAF5, le pourcentage de protéines Phospho-IKK α/β ou VSV-G-IKK β associées à Tax décroît massivement par rapport aux siARN contrôles (plus de 50%, **FIGURES 64B** et **64A**, pistes 4 et 5), comme dans les **FIGURES 62B** et **63B**. Cette baisse, similaire pour les protéines Phospho-IKK α/β et VSV-G-IKK β , atteste de l'implication de TRAF5 dans le recrutement par Tax de la sous-unité IKK β , sous forme phosphorylée ou non. Au niveau des lysats cellulaires, l'expression des protéines Phospho-IKK α/β ou VSV-G-IKK β n'est pas diminuée avec les siTRAF5 par rapport aux siARN contrôles, mais au contraire augmentée (**FIGURES 64C** et **64A**, lysats, pistes 4 et 5), écartant ainsi la participation de TRAF5 au mécanisme de phosphorylation d'IKK β .

Ces résultats démontrent que TRAF5 contribue au recrutement de la sous-unité IKK β par Tax, comme nous l'avons mis en évidence précédemment pour IKK α . L'ensemble des expériences de co-immunoprécipitation réalisées avec les protéines Myc-IKK α et VSV-G-IKK β permet donc de valider le modèle séquentiel de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax décrit auparavant, dans lequel la protéine TRAF5 participe à la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , sans toutefois induire l'activation par phosphorylation de ces deux sous-unités catalytiques dans les cellules.

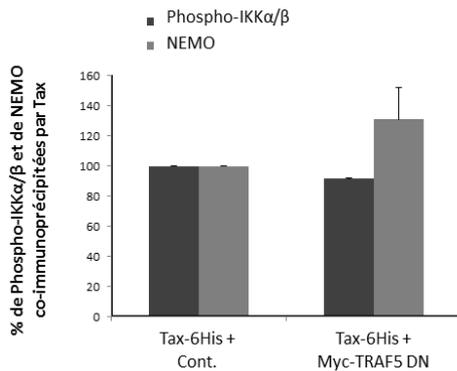
II.3.2. Analyse du recrutement et de l'activation du complexe IKK par Tax lors du blocage de l'activité de TRAF5

Pour préciser le rôle de TRAF5 dans notre modèle de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax, et notamment dans la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , nous avons voulu déterminer si l'activité ligase de TRAF5 intervenait dans ce mécanisme (**FIGURE 65**). Pour cela, nous avons effectué des expériences de co-immunoprécipitation de Tax lors du blocage de l'activité de l'enzyme TRAF5 endogène, grâce au mutant TRAF5 DN employé précédemment. Nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec le plasmide Tax-6His et avec, soit la construction codant pour le mutant TRAF5 DN (Myc-TRAF5 DN), soit les siARN TRAF5 (siTRAF5) ou des siARN contrôles (siCont.) afin de comparer les effets du blocage de l'activité ou de l'expression de TRAF5 sur le recrutement des sous-unités du complexe IKK par Tax. 48h après, les cellules ont été lysées puis la protéine Tax a été co-immunoprécipitée grâce à un anticorps monoclonal anti-Tax. Les protéines endogènes associées ont ensuite été identifiées par immunoblot avec un anticorps anti-Phospho-IKK α/β et avec un anticorps anti-NEMO (**FIGURE 65A**).

A.



B.



C.

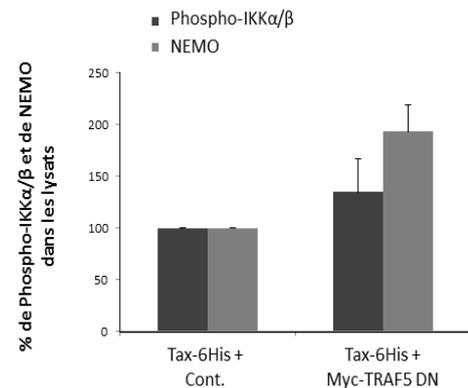


FIGURE 65 : L'activité ligase de TRAF5 n'est impliquée ni dans le recrutement d'IKKα et β par Tax, ni dans la phosphorylation de ces sous-unités.

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec (A.), un plasmide pSG5m contrôle (piste 1) ou avec un plasmide codant pour la protéine Tax-6His (pistes 2 à 5) associé soit à une construction codant pour la protéine Myc-TRAF5 DN (piste 3), soit à des siARN TRAF5 (piste 5) ou à des siARN contrôles (piste 4). 48 heures après, les cellules ont été lysées. Une partie des lysats cellulaires a été directement analysée par immunoblot pour étudier l'expression endogène des protéines du complexe IKK ainsi que celle de la protéine Tax (lysats). Dans l'autre partie, Tax a été co-immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal anti-Tax afin d'identifier ses partenaires protéiques (Co-IP Tax). Les protéines co-immunoprécipitées ont ensuite été analysées par immunoblot avec les anticorps anti-Phospho-IKKα/β et anti-NEMO, ainsi qu'avec un mélange de sera de patients infectés par HTLV-1 (Tax) et avec un anticorps anti-Myc permettant de détecter la protéine Myc-TRAF5 DN. Les quantités de protéines Phospho-IKKα/β ou NEMO mesurées dans les Co-IP ou dans les lysats ont été normalisées sur celles des protéines Tax. Les pourcentages représentés sur le graphique B. correspondent aux moyennes des quantités normalisées de protéines Phospho-IKKα/β ou NEMO qui ont été co-immunoprécipitées par Tax dans deux expériences indépendantes. Les pourcentages du graphique C. représentent les moyennes des expressions de ces protéines, mesurées dans les lysats cellulaires de ces deux mêmes expériences. (B. et C.) Les pourcentages de co-immunoprécipitation et d'expression déterminés avec TRAF5 DN ont été calculés en fonction de ceux obtenus pour les protéines Tax seules (fixés à 100%).

Les moyennes des signaux obtenus pour les protéines Phospho-IKK α/β ou NEMO, mesurés lors de deux expériences indépendantes, ont été représentées sous forme de graphiques correspondant aux pourcentages de co-immunoprécipitation de ces protéines avec Tax (**FIGURE 65B**), ainsi qu'à leurs niveaux d'expression dans les lysats cellulaires (**FIGURE 65C**). Les signaux mesurés pour Phospho-IKK α/β ou NEMO ont été normalisés sur ceux de la protéine Tax associée et les valeurs obtenues pour Tax seule ont été fixées à 100% (**FIGURES 65B et 65C**).

En ce qui concerne les co-immunoprécipitations, aucune protéine Tax n'est détectée lorsque les cellules ont été transfectées avec le vecteur contrôle (**FIGURE 65A**, piste 1), attestant de la spécificité de l'anticorps monoclonal anti-Tax utilisé dans ces expériences. Par ailleurs, des protéines IKK α et IKK β phosphorylées ainsi que des protéines NEMO endogènes sont co-immunoprécipitées lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Tax-6His (**FIGURE 65A**, piste 2) mais pas avec le vecteur contrôle (**FIGURE 65A**, piste 1). Ces résultats permettent de valider nos expériences en démontrant le recrutement et l'activation spécifiques des sous-unités du complexe IKK par la protéine Tax.

En présence du mutant TRAF5 DN, le pourcentage de protéines Phospho-IKK α/β co-immunoprécipitées avec Tax-6His reste quasiment inchangé par rapport à la protéine Tax seule (**FIGURES 65B et 65A**, pistes 2 et 3) tandis que la quantité de NEMO associées à Tax-6His est augmentée (**FIGURES 65B et 65A**, pistes 2 et 3). L'activité ligase de TRAF5 n'est donc pas impliquée dans le recrutement des sous-unités du complexe IKK par Tax.

En présence des siARN TRAF5, l'association entre Tax et les sous-unités endogènes IKK α et IKK β phosphorylées est fortement réduite par rapport aux siARN contrôles (environ 60%, **FIGURE 65A**, pistes 4 et 5), comme dans la **FIGURE 62A**. A l'inverse, la quantité de NEMO associées à Tax-6His reste inchangée par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 65A**, pistes 4 et 5). Ces résultats confirment le rôle spécifique de TRAF5, qui a été décrit précédemment, dans le recrutement d'IKK α et β par Tax.

Au niveau des lysats cellulaires, l'expression des protéines Phospho-IKK α/β et NEMO est augmentée avec le mutant TRAF5 DN par rapport à Tax-6His seule (**FIGURES 65C et 65A**, lysats, pistes 2 et 3).

En présence des siTRAF5 l'expression des protéines IKK α et IKK β phosphorylées ainsi que celle des protéines NEMO ne varient quasiment pas par rapport aux siARN contrôles (**FIGURE 65A**, lysats, pistes 4 et 5), comme nous l'avons constaté dans la **FIGURE 62A**.

Ces analyses confirment que la protéine TRAF5, avec ou sans son activité ligase, ne participe pas au mécanisme d'activation par phosphorylation des sous-unités catalytiques du complexe IKK induit par Tax.

En résumé, l'utilisation du mutant TRAF5 DN dans ces expériences de co-immunoprécipitation démontre que TRAF5 induit la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β indépendamment de son activité E3 ligase, ce qui permet d'affiner notre modèle de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax.

Lors de ces expériences de co-immunoprécipitation avec TRAF5 DN, nous avons également étudié l'existence d'une possible interaction entre Tax et TRAF5, qui participerait au rôle de cette enzyme dans le recrutement d'IKK α et d'IKK β par Tax. A partir des complexes protéiques co-immunoprécipités avec l'anticorps monoclonal anti-Tax, nous avons donc réalisé un immunoblot avec un anticorps anti-Myc permettant de détecter la protéine Myc-TRAF5 DN employée dans ces expériences et ainsi, de visualiser si elle est capable d'interagir avec Tax (**FIGURE 65A**).

Un signal net et spécifique correspondant au mutant TRAF5 DN est observé uniquement lorsque les cellules ont été transfectées avec la construction Myc-TRAF5 DN (**FIGURE 65A**, piste 3).

Ces analyses prouvent que la protéine Tax interagit avec le mutant TRAF5 DN, ce qui conforte le rôle essentiel de cette enzyme dans le mécanisme de formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , que nous avons mis en évidence. Avec ces expériences, nous montrons également que le domaine RING et les motifs à doigt de zinc, absents du mutant TRAF5 DN, ne sont pas les régions qui sont mises en jeu dans l'interaction entre Tax et TRAF5.

Pour conclure, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude décrit un nouveau rôle de l'enzyme TRAF5 dans l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax, distinct de ses fonctions d'ubiquitine ligase qui ont été montrées dans le cadre d'une activation de la voie NF- κ B à partir des récepteurs du TNF (Tada et al., 2001).

Nous avons découvert que ce nouveau rôle de la protéine TRAF5 ne fait pas intervenir son activité ligase, démontrant ainsi que TRAF5 n'est pas l'enzyme E3 ligase de la protéine Tax. Toutefois, nous avons prouvé que TRAF5 était nécessaire à l'ubiquitinylation de Tax, notamment avec des chaînes d'ubiquitine liées en K63.

L'interaction entre Tax et TRAF5 DN, que nous avons révélée dans nos expériences, suggère donc que TRAF5 agit comme une protéine adaptatrice en se liant à Tax, ce qui pourrait permettre le recrutement d'une deuxième enzyme E3 ligase, qui serait directement responsable d'une partie de l'ubiquitylation de Tax.

Nous avons également découvert que TRAF5 induit la formation du complexe Tax/IKK α /IKK β , toujours indépendamment de son activité ligase. L'ubiquitylation de Tax ayant été décrite, notamment par notre laboratoire, comme étant essentielle au recrutement et à l'activation du complexe IKK par Tax (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008; Nasr, 2006; Shibata et al., 2011), nous pouvons clairement établir un lien de corrélation entre les différentes implications de TRAF5 que nous avons mises en évidence. Ainsi, en favorisant l'ubiquitylation de Tax, TRAF5 induit le recrutement des sous-unités catalytiques IKK α et β par Tax, participant à la formation et à l'activation du complexe IKK et par conséquent, à l'activation de l'ensemble de la voie NF- κ B, comme nous l'avons montré lors de nos expériences de transactivation.

Nous avons toutefois prouvé que la protéine TRAF5 ne contribue pas à l'activation par phosphorylation d'IKK α et d'IKK β , suggérant notamment que TRAF5 n'induit pas le recrutement d'une protéine kinase au niveau du complexe Tax/IKK.

Par ailleurs, nos analyses ont montré que TRAF5 n'est pas impliquée dans l'association de la protéine Tax avec NEMO, démontrant pour la première fois l'existence de deux étapes distinctes dans le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax : d'un côté la formation du complexe Tax/NEMO et de l'autre, le recrutement par Tax des sous-unités IKK α et IKK β .

Notre étude apporte donc de nouveaux éléments permettant de décrypter plus précisément le mécanisme d'ubiquitylation de Tax et d'établir un nouveau modèle séquentiel pour la formation du complexe Tax/IKK, qui constitue l'événement central dans l'activation de la voie NF- κ B, au sein des cellules infectées par le virus HTLV-1. Elle met également en lumière un nouvel acteur impliqué dans ces mécanismes, la protéine TRAF5, au rôle essentiel et jamais encore décrit dans ce contexte.



*Discussion et
Perspectives*



I. BILAN DES RECHERCHES

La protéine Tax, en dérégulant de nombreux partenaires et voies de signalisation cellulaires impliqués dans des processus biologiques essentiels à la cellule, représente un élément clé de la pathogenèse dans les infections par HTLV-1. L'activation constitutive de la voie NF- κ B induite par Tax est notamment l'un des mécanismes centraux conduisant à l'immortalisation et à la transformation des cellules infectées. L'étude des processus moléculaires d'activation de cette voie, mis en place par l'oncoprotéine virale, est donc indispensable pour le développement d'approches thérapeutiques ciblées. En effet, la connaissance de ces processus permettrait d'élaborer des stratégies visant à bloquer les effets de Tax au niveau de la voie NF- κ B et ainsi, de limiter l'apparition d'un phénotype transformé dans les cellules infectées, à l'origine de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATLL). Par ailleurs, ces études peuvent également contribuer à une meilleure compréhension des dérèglements de la voie NF- κ B, observés fréquemment dans différents cancers qui ne sont pas liés à une infection par HTLV (Chang and Vancurova, 2013; Chaturvedi et al., 2011; Xiao and Fu, 2011).

Les recherches menées par différentes équipes, dont notre laboratoire, ont permis l'élaboration d'un modèle d'activation de la voie NF- κ B, dans lequel les modifications post-traductionnelles de Tax tiennent une place importante dans ses fonctions activatrices (**FIGURE 51**). Ainsi, l'ubiquitylation de Tax a été décrite comme nécessaire pour le recrutement et l'activation du complexe IKK, au niveau de structures spécifiques appelées compartiments périnucléaires. La SUMOylation de la protéine virale a, quant à elle, été impliquée dans l'activation optimale de la transcription dépendante de NF- κ B, au sein de corps nucléaires caractéristiques (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006).

Toutefois, de nombreuses interrogations persistent dans ce modèle, comme l'implication réelle de la SUMOylation de Tax et des corps nucléaires dans l'activation de la voie, que nous avons remise en cause dans une étude récente (Bonnet et al., 2012). L'identification de l'ubiquitine ligase de Tax constitue également un enjeu majeur pour déterminer le mécanisme précis d'association entre la protéine virale et le complexe IKK.

Les travaux que j'ai réalisés au cours du doctorat se sont donc axés sur ces questions et nous ont amené à repenser le modèle d'activation de la voie NF- κ B par Tax qui avait été établi.

En effet, grâce à une stratégie d'inhibition de la machinerie de SUMOylation endogène, nous avons démontré que cette modification post-traductionnelle de Tax n'était pas essentielle pour l'activation NF- κ B, répondant ainsi à la controverse suscitée par notre précédente étude et permettant de clarifier le débat autour de cette question.

Par ailleurs, nos recherches sur l'enzyme E3 ligase impliquée dans l'ubiquitylation de Tax, notamment avec des chaînes liées en K63, nous ont permis de mettre au jour un mécanisme séquentiel inédit de formation du complexe Tax/IKK, dans lequel la protéine TRAF5 joue un rôle central en favorisant le recrutement des sous-unités catalytiques IKK α et IKK β , indépendamment de son activité ligase et sans être impliquée dans l'association Tax/NEMO.

Ces résultats permettent donc de préciser le modèle d'activation de la voie NF- κ B induite par Tax mais soulèvent également de nouvelles questions, concernant par exemple le rôle de la SUMOylation de la protéine virale dans ses fonctions. Ils appellent en outre à la réalisation de recherches supplémentaires, afin d'approfondir le mécanisme de formation du complexe Tax/IKK en déterminant les autres acteurs impliqués, dont l'E3 ligase de Tax fonctionnant avec la protéine TRAF5.

II. LA SUMOYLATION DE TAX ET L'ACTIVATION NF- κ B : DES RÉPONSES A L'ORIGINE DE NOUVELLES PROBLÉMATIQUES

La mise au point d'une nouvelle stratégie, fondée sur l'inhibition du processus cellulaire de SUMOylation endogène des protéines, s'est avérée être une technique très intéressante et efficace pour étudier l'implication de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, distinctement de son ubiquitinylation. En effet, en bloquant l'enzyme Ubc9, qui correspond à l'unique E2 de conjugaison identifiée dans ce processus, nous avons été capables de générer des protéines Tax non conjuguées aux molécules SUMO-1 ou SUMO-2/3, mais parfaitement ubiquitinylées (**FIGURE 53**).

Ce phénotype, obtenu sans mutations de la séquence protéique de Tax, comme c'était le cas dans les études passées (Bonnet et al., 2012; Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006), garantit donc le ciblage spécifique de cette modification post-traductionnelle, sans altérations potentielles d'autres modifications ou fonctions de la protéine virale. L'emploi de cette technique pourrait ainsi être envisagé pour remplacer celui des mutants de lysines, dans la détermination du rôle de la SUMOylation de Tax au niveau de ses différentes propriétés oncogènes.

Grâce à cette stratégie, nous avons donc prouvé que le blocage d'Ubc9 n'empêchait pas la protéine Tax non SUMOylée d'activer, au même niveau qu'une protéine Tax sauvage, la transcription à partir de promoteurs à éléments de réponse κ B dans des cellules adhérentes. Ces données ont par ailleurs été obtenues avec différents modèles de promoteurs, qu'ils soient transfectés, intégrés stablement dans la chromatine cellulaire ou encore endogènes (**FIGURES 55, 56 et 57**). Ces résultats similaires, quel que soit le modèle, montrent que la SUMOylation de Tax n'est pas impliquée dans son interaction avec les promoteurs dépendants de NF- κ B. De plus, les analyses effectuées notamment avec le promoteur du gène ICAM-1, qui est une cible connue de NF- κ B, montrent que la SUMOylation de Tax n'est pas nécessaire au recrutement des dimères NF- κ B ou des acteurs de la machinerie de transcription cellulaire, comme les histones acétylases CBP/p300, au niveau des promoteurs à éléments de réponse κ B endogènes. Différentes études ont même montré que la conjugaison d'acteurs de la transcription à des protéines SUMO a plutôt un effet répresseur qu'activateur sur l'expression génique, confortant nos analyses (Cubéñas-Potts and Matunis, 2013; Gill, 2005; Girdwood et al., 2004).

L'impact de la SUMOylation pouvant être différent suivant le type cellulaire (Treuter and Venteclef, 2011), nous avons étudié son rôle dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax dans des lymphocytes T, qui sont les cibles préférentielles de l'infection par HTLV-1 *in vivo* (Richardson et al., 1990). Notre stratégie d'inhibition de la machinerie de SUMOylation endogène, via le blocage d'Ubc9, s'est avérée tout aussi efficace que dans les cellules adhérentes, confirmant que cette modification post-traductionnelle était bien contrôlée par l'enzyme E2 Ubc9 au sein des lymphocytes T (**FIGURE 58**). Dans ce contexte, les protéines Tax non SUMOylées, mais toujours ubiquitinylées, sont parfaitement capables d'activer des promoteurs à éléments de réponse κ B transfectés dans les cellules T.

L'absence d'implication de cette modification post-traductionnelle de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, pose par conséquent de nouvelles interrogations quant à son utilité pour la protéine virale.

II.1. Quel rôle pour la SUMOylation de Tax ?

Nos résultats démontrent clairement que la conjugaison de Tax aux SUMO n'est pas nécessaire pour que la protéine virale active la voie NF- κ B. Or ce mécanisme est essentiel pour l'immortalisation et la transformation des cellules infectées par HTLV-1 (Cheng et al., 2012; Qu and Xiao, 2011). Il serait donc intéressant d'effectuer des tests d'immortalisation de lymphocytes T par Tax, en bloquant ou non la machinerie de SUMOylation endogène grâce à la stratégie que nous avons développée, afin de déterminer l'impact de cette modification post-traductionnelle sur l'ensemble des propriétés oncogènes de Tax.

Par ailleurs, la réalisation d'expériences dans un contexte proviral permettrait de déterminer si la SUMOylation de Tax entre en jeu dans la régulation de ses relations avec les autres protéines virales, notamment avec les protéines régulatrices et auxiliaires, participant à la transformation cellulaire.

D'autre part, la SUMOylation étant impliquée dans la stabilisation ou au contraire dans la dégradation de protéines cellulaires, comme l'inhibiteur I κ B α (Aillet et al., 2012; Desterro et al., 1998), une hypothèse avancée serait que cette modification joue le même rôle au niveau de Tax. Cependant, dans nos différentes expériences, analysées 24h, 48h ou 72h après la transfection de la protéine virale, le blocage d'Ubc9 n'entraînait pas une dégradation des protéines Tax non SUMOylées par rapport aux Tax sauvages, ni une diminution de l'expression de leurs transcrits dans les cellules. Nous n'avons pas non plus constaté une plus grande stabilité de la protéine virale au cours du temps.

Une autre possibilité serait que la SUMOylation de Tax module sa localisation subcellulaire, comme c'est notamment le cas pour NEMO (McCool and Miyamoto, 2012). Les corps nucléaires pourraient alors jouer le rôle de compartiments de stockage de Tax, plutôt que de structures transcriptionnellement actives. L'existence de l'ubiquitine ligase SUMO-dépendante RNF4, responsable de l'export nucléaire de la protéine virale favorisant ainsi l'activation de la voie NF- κ B, appuie cette hypothèse (Fryrear et al., 2012). Toutefois, cette E3 ligase est connue pour agir dans un contexte particulier, comme par exemple en cas de stress génotoxique, ce qui limite son action.

Des expériences d'immunofluorescence, réalisées en inhibant ou non la machinerie de SUMOylation endogène, permettraient de visualiser les possibles changements de localisation de Tax dans les cellules, en fonction de leur niveau de conjugaison à des protéines SUMO.

II.2. La place d'Ubc9 dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax

La SUMOylation de Tax n'étant pas nécessaire à l'activation NF- κ B, la question du rôle de l'enzyme E2 Ubc9, essentielle à la conjugaison des SUMO aux substrats, se pose.

De façon intéressante, dans les expériences de transactivation de promoteur effectuées avec des cellules adhérentes HEK 293T, nous avons observé que le blocage de l'expression de l'enzyme Ubc9 endogène, avec des siARN spécifiques, entraînait une augmentation de l'activation des promoteurs dépendants de NF- κ B par Tax (**FIGURES 55B** et **56B**), ce qui n'était pas le cas lors du blocage de son activité enzymatique. De plus, dans les lymphocytes T, le mutant catalytiquement inactif Ubc9-C93S augmente également la transcription induite par Tax à partir de promoteurs à éléments de réponse κ B (**FIGURE 58B**). Ainsi, nos résultats suggèrent qu'Ubc9 exerce un effet négatif sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax, via un mécanisme dépendant ou indépendant de la SUMOylation, suivant le type cellulaire. Il faut noter que des études ont déjà montré qu'Ubc9 favorisait la répression de l'expression génique via la SUMOylation de facteurs de transcription cellulaires, (Chen et al., 2013) ou, de façon indépendante à la conjugaison de protéines SUMO, en interagissant avec des transactivateurs viraux et en inhibant leur action (Tomoiu et al., 2006).

D'autre part, des expériences d'immunofluorescence que nous avons effectué dans des cellules HEK 293T, pour visualiser les possibles changements de distribution subcellulaire de Tax, en fonction du blocage de l'expression ou de l'activité d'Ubc9, suggèrent que cette enzyme participe au transport de la protéine virale dans les corps nucléaires, indépendamment de son activité catalytique. Avec des siARN dirigés spécifiquement contre Ubc9,

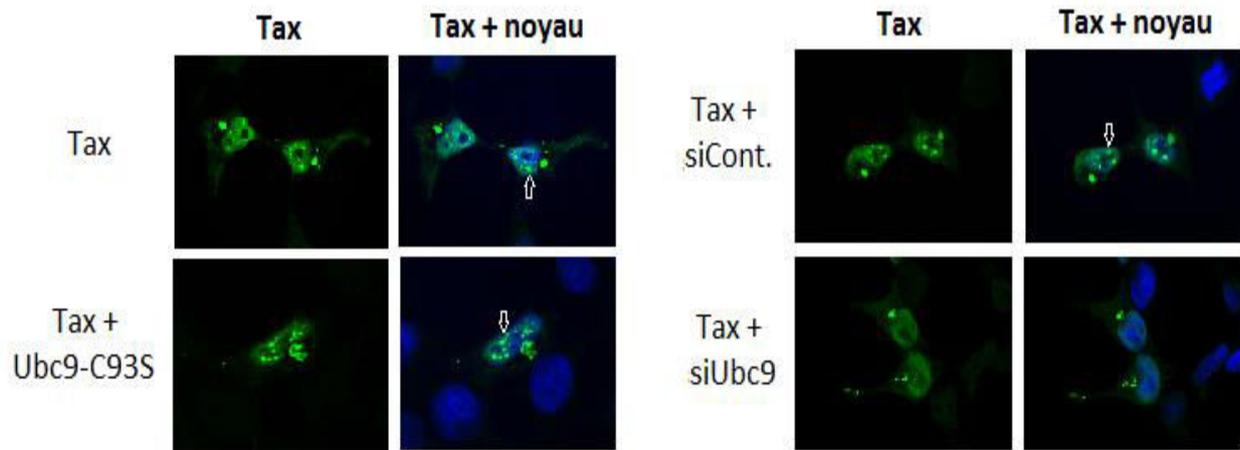


FIGURE 66 : Ubc9 pourrait réprimer l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax en favorisant son transport dans les corps nucléaires.

Visualisation des changements de localisation subcellulaire de la protéine Tax lors du blocage de l'expression d'Ubc9 avec des siARN spécifiques (siUbc9) ou lors du blocage de l'activité catalytique de l'enzyme avec le mutant Ubc9-C93S. Les protéines Tax non SUMOylées avec les siUbc9 sont moins présentes dans le noyau et ne forment plus de corps nucléaires. En revanche, avec le mutant Ubc9-C93S, les protéines Tax non SUMOylées peuvent tout de même se localiser dans le noyau au niveau de corps nucléaires. Tax est marquée en vert, le noyau en bleu et les corps nucléaires sont indiqués par les flèches blanches. Les marquages sont observés au microscope spinning disk leica, avec un objectif 63X.

Tax est en effet moins présente dans le noyau et n'est pas localisée au sein de corps nucléaires mais est plutôt diffuse (**FIGURE 66**). Au contraire, avec le mutant catalytiquement inactif Ubc9-C93S, la distribution de Tax, qui n'est donc pas SUMOylée, est la même que celle d'une protéine Tax sauvage, avec notamment son regroupement au niveau de corps nucléaires. En induisant la localisation de la protéine virale dans le noyau, l'enzyme Ubc9 pourrait diminuer l'interaction entre Tax et le complexe IKK au niveau du cytoplasme, réduisant ainsi l'activation de la voie NF- κ B. Des expériences d'immunofluorescence supplémentaires doivent être menées pour confirmer cette hypothèse, afin de visualiser l'activation NF- κ B, via la migration dans le noyau du dimère p50/RelA, lors de l'inhibition de l'expression d'Ubc9 avec des siARN ou en présence du mutant Ubc9-C93S. Il serait également intéressant d'étudier une potentielle interaction entre Tax et Ubc9 par des expériences de co-immunoprécipitation. Des analyses dans les cellules T doivent en outre être effectuées car le mécanisme répressif d'Ubc9 sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax semble différent par rapport aux cellules adhérentes.

II.3. La SUMOylation des protéines cellulaires est-elle impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B ?

Dans nos analyses, nous avons constaté que le blocage de l'expression ou de l'activité de l'enzyme Ubc9 réduisait massivement la conjugaison de l'ensemble des protéines cellulaires à des SUMO-3 transfectées (**FIGURE 54**). Ces résultats suggèrent que la SUMOylation *de novo* de différents co-facteurs, impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax, n'est pas nécessaire à ce processus. Toutefois, les protéines SUMOylées ayant une durée de vie longue, il est possible que leur modification avant l'inhibition d'Ubc9 contribue à l'activation NF- κ B par Tax (Hannoun et al., 2010; Wilkinson and Henley, 2010).

D'autre part, nous nous sommes également intéressés à l'implication de la SUMOylation des protéines, dans le cadre d'une activation cytokinique de la voie NF- κ B, en stimulant les cellules au TNF α (Baud and Karin, 2001), lors d'expériences de transactivation. Comme dans le cas de la protéine virale Tax, l'inhibition de la conjugaison des protéines cellulaires aux SUMO n'empêche pas l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B, mais au contraire semble la favoriser. Cependant, une étude a montré que la SUMOylation de NEMO, protéine centrale dans la voie NF- κ B, était nécessaire à l'activation du complexe IKK en cas de stress génotoxique (McCool and Miyamoto, 2012). Ce mécanisme étant restreint à un contexte particulier, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette modification de NEMO sur l'activation NF- κ B lors d'une stimulation cytokinique, afin de confirmer nos résultats.

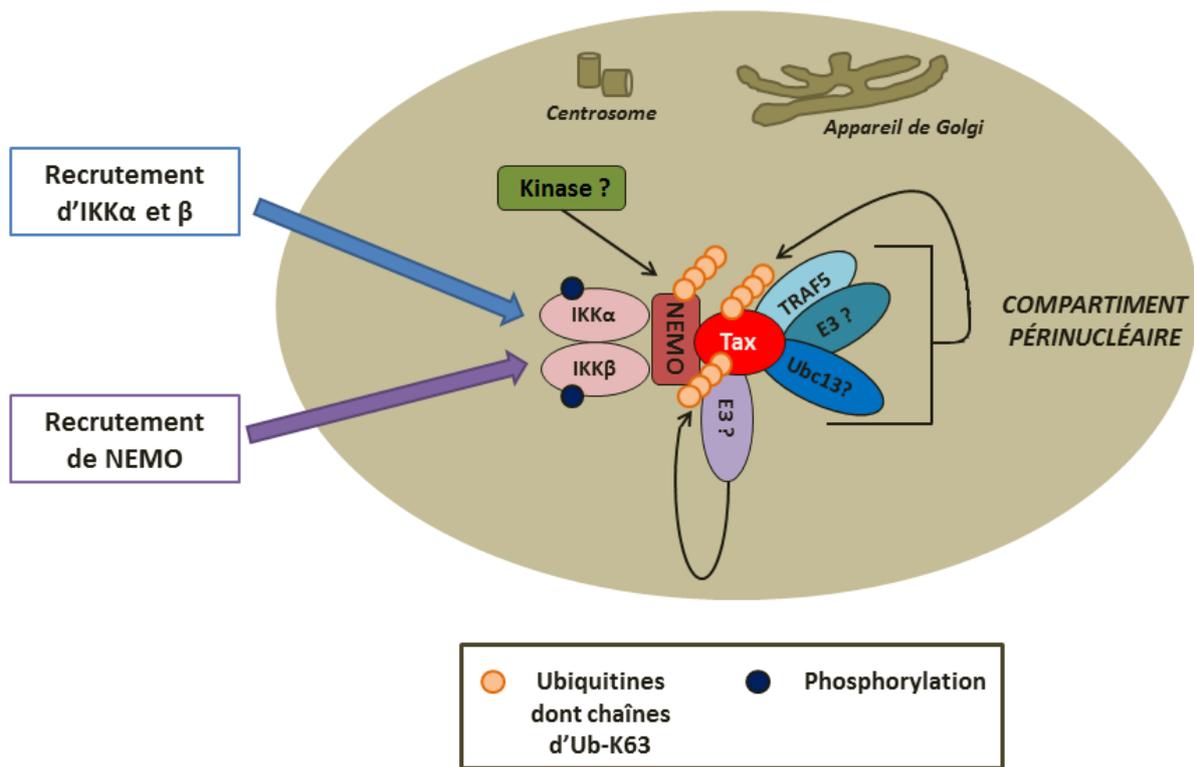


FIGURE 67 : Nouveau modèle de formation du complexe Tax/IKK proposé, faisant intervenir deux étapes dont l'une est dépendante de TRAF5.

Représentation schématique du modèle de recrutement et d'activation du complexe IKK par Tax, défini à partir des recherches que nous avons menées. Ce mécanisme est réparti en deux étapes : d'un côté la formation du complexe Tax/NEMO et de l'autre, le recrutement par Tax des sous-unités IKK α et IKK β , dépendant de TRAF5. L'enzyme TRAF5 induit l'ubiquitinylation partielle de la protéine virale, notamment avec des chaînes K63, indépendamment de son activité ligase, en recrutant une deuxième E3 ligase. Cette conjugaison de Tax aux ubiquitines conduit au recrutement d'IKK α et β . Par ailleurs, une autre ubiquitine ligase doit probablement intervenir dans l'ubiquitinylation de Tax, favorisant le recrutement de NEMO et contribuant également à son ubiquitinylation, nécessaire à l'activation optimale du complexe IKK pour permettre notamment le recrutement de kinases.

III. L'ASSOCIATION DU COMPLEXE TAX/IKK : UN NOUVEAU MÉCANISME A COMPLÉTER

Grâce à nos recherches, nous avons détaillé le mécanisme d'ubiquitinylation de la protéine Tax, ce qui nous a permis d'établir un modèle séquentiel pour la formation et l'activation du complexe Tax/IKK. Ce modèle fait intervenir un nouvel acteur essentiel, la protéine TRAF5, qui avait jusqu'à présent été identifiée dans l'activation de la voie NF- κ B suite à une stimulation par le TNF ou via les récepteurs RIG-I (Tada et al., 2001; Xie, 2013). Nous avons en effet montré que l'enzyme TRAF5 favorisait l'ubiquitinylation de Tax, indépendamment de son activité ligase, induisant le recrutement des sous-unités catalytiques IKK α et β (**FIGURE 67**). Toutefois, nos résultats montrent que TRAF5 n'est pas impliquée dans l'association Tax/NEMO.

Ces données permettent pour la première fois de détailler le mécanisme de formation du complexe Tax/IKK, qui restait jusqu'à présent flou, basé sur une unique étape dans laquelle la protéine Tax ubiquitinylée recrutait NEMO, entraînant alors l'arrivée des sous-unités IKK α et IKK β (Harhaj and Sun, 1999; Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008).

Nos expériences de transactivation, menées dans des cellules adhérentes, ont confirmé que le rôle de TRAF5 dans la formation du complexe Tax/IKK était important pour l'activation de l'ensemble de la voie NF- κ B, en favorisant la transcription de promoteur à éléments de réponse κ B (**FIGURE 61**). Nous avons par ailleurs obtenu les mêmes résultats en effectuant ces transactivations dans des cellules HEK 293T NF- κ B stable, contenant des promoteurs intégrés stablement dans la chromatine cellulaire, ou encore dans des lymphocytes T.

Contrairement à l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF ou les récepteurs RIG-I, pour lesquelles TRAF5 doit s'autoubiquitinyler pour favoriser le recrutement et l'activation du complexe IKK (Tada et al., 2001; Xie, 2013), nous avons prouvé que l'activité ubiquitine ligase de TRAF5 n'était pas impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax, entraînant son association aux protéines IKK α et β (**FIGURES 60 et 65**). Nos résultats suggèrent même un effet négatif de l'activité ligase de TRAF5 sur l'ubiquitinylation de la protéine virale (**FIGURE 60**). Il serait intéressant d'étudier ce mécanisme et de voir si TRAF5 s'autoubiquitinylyle ou est capable d'ubiquitinyler l'E3 ligase qu'elle recrute au niveau de Tax, induisant un potentiel changement de conformation de cette enzyme E3, notamment au niveau de son domaine RING, essentiel à sa fonction (Joazeiro and Weissman, 2000; Xie, 2013).

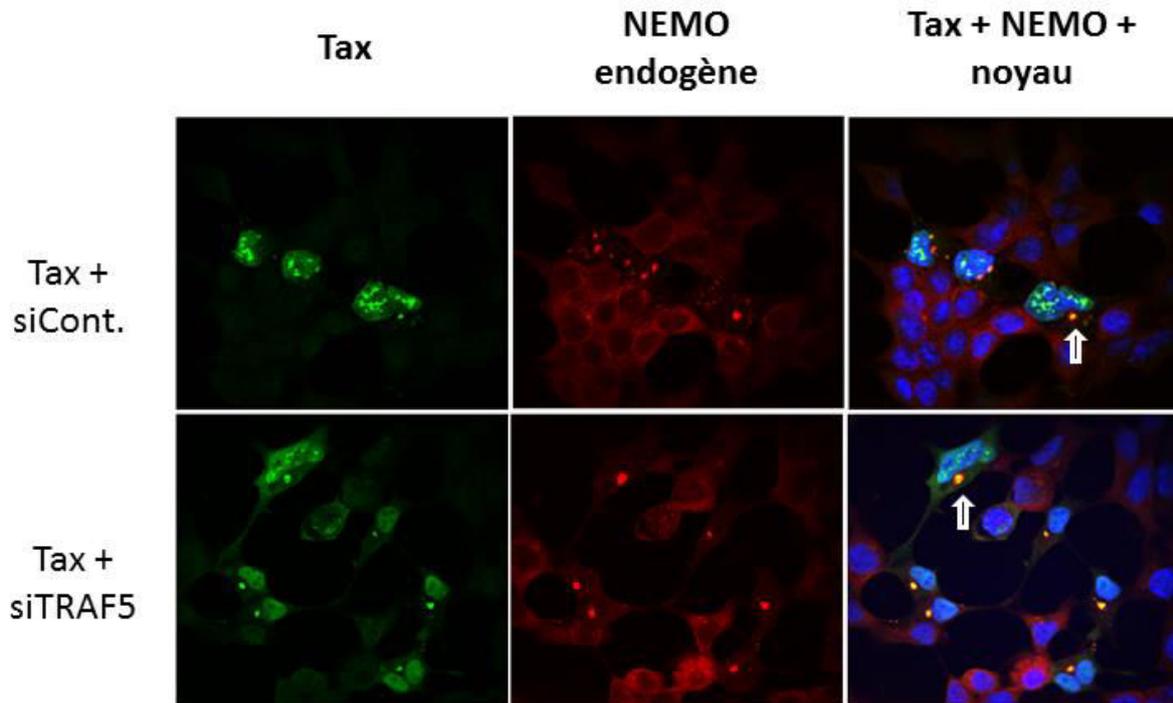


FIGURE 68 : L'inhibition de l'expression de TRAF5 ne diminue pas la colocalisation de Tax et NEMO dans le compartiment périnucléaire.

Visualisation de la localisation subcellulaire des protéines Tax et NEMO endogènes lors du blocage de l'expression de TRAF5, avec des siARN spécifiques (siTRAF5). Tax (marquée en vert) et NEMO (marquée en rouge) colocalisent au niveau du compartiment périnucléaire, indiqué par les flèches blanches. La présence des siTRAF5 ne modifie pas leur distribution dans les cellules puisque les deux protéines colocalisent toujours au sein de cette structure cytoplasmique. Le noyau est marqué en bleu. Les marquages sont observés au microscope spinning disk leica, avec un objectif 63X.

Cette modification de conformation pourrait en effet provoquer une diminution de l'ubiquitylation de la protéine virale, à l'origine de l'effet négatif observé dans nos résultats.

A travers nos analyses, nous avons montré que TRAF5 n'était pas l'enzyme E3 ligase de la protéine Tax, bien qu'elle soit nécessaire à son ubiquitylation, notamment avec des chaînes d'ubiquitine liées en K63 (**FIGURES 59 et 60**). L'enzyme TRAF5 agirait plutôt comme une protéine adaptatrice en se liant à Tax, ce qui permettrait le recrutement d'une deuxième enzyme E3 ligase, qui serait directement responsable d'une partie de l'ubiquitylation de la protéine virale (**FIGURE 67**). Nos résultats ont en effet démontré l'interaction existante entre Tax et le mutant TRAF5 DN, dans lequel le domaine RING et les motifs à doigt de zinc ont été enlevés, excluant par conséquent leur implication dans cette liaison avec la protéine virale. Dans de précédentes expériences de co-immunoprécipitation, nous avons déjà mis en évidence l'interaction entre Tax et une protéine TRAF5 sauvage transfectée. L'identification des régions de Tax et de TRAF5 responsables de cette interaction permettrait de détailler le modèle que nous proposons. Des études réalisées par l'équipe d'Edward William Harhaj ont déjà mis en évidence la présence d'un motif d'interaction à TRAF6 dans la séquence protéique de Tax, situé à proximité du motif PBM en C-terminal (Lavorgna and Harhaj, 2014). Il serait intéressant d'étudier si ce motif joue également un rôle dans la liaison à TRAF5. Il faudrait d'autre part confirmer l'interaction entre la protéine virale et des enzymes TRAF5 endogènes, grâce des co-immunoprécipitations de Tax.

Par ailleurs, des expériences d'immunofluorescence effectuées par notre laboratoire démontrent la colocalisation de Tax, NEMO et TRAF5 au niveau du compartiment périnucléaire, appuyant l'implication de cette enzyme dans l'association du complexe Tax/IKK, connue pour se dérouler au niveau de cette structure caractéristique (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008). Il faut aussi noter que le blocage de l'expression de TRAF5 par des siARN spécifiques ne diminue pas la colocalisation entre Tax et NEMO dans le compartiment périnucléaire, confortant notre modèle dans lequel l'enzyme TRAF5 n'intervient pas dans la liaison Tax/NEMO (**FIGURE 68**). De façon intéressante dans nos analyses, TRAF5 colocalise avec Tax dans seulement 20% des cellules exprimant la protéine virale. Or une étude précédente a mis en évidence une distribution simultanée de Tax et de NEMO au niveau du compartiment périnucléaire dans près de 90% des cellules exprimant la protéine virale, tandis que nous avons constaté que Tax colocalise avec les sous-unités IKK α et β sous formes phosphorylées dans 20% des cellules, comme dans le cas de TRAF5 (Kfoury et al., 2008).

Ces données confirment donc le lien que nous avons établi entre le recrutement d'IKK α et β au niveau de Tax et l'expression de la protéine TRAF5.

Enfin, nos expériences de purification de Tax sur billes de nickel, permettant d'analyser l'ubiquitinylation de cette protéine lors du blocage de TRAF5, suggèrent l'implication d'une autre ubiquitine ligase, en plus de celle recrutée par TRAF5. En effet, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de TRAF5 n'entraîne pas une absence totale de conjugaison de la protéine virale aux ubiquitines, et notamment aux chaînes liées en K63 (**FIGURES 59** et **60**). Il est possible que cette E3 ligase, contribuant à l'ubiquitinylation de Tax, favorise le recrutement de la protéine NEMO (Harhaj et al., 2006; Kfoury et al., 2008, 2012; Shembade et al., 2007) (**FIGURE 67**). Cette enzyme pourrait également conjuguer NEMO à des chaînes d'ubiquitine K63 provoquant son oligomérisation, son changement de conformation ou encore le recrutement de kinases comme TAK1, nécessaires à l'activation du complexe IKK (Gautheron and Courtois, 2010; Ni et al., 2008). L'ubiquitine ligase TRAF6, décrite comme étant responsable de la polyubiquitinylation K63 de NEMO en cas de stimulations cytokiniques ou d'activations du récepteur des lymphocytes T (Sebban-Benin et al., 2007; Sun et al., 2004), serait une candidate potentielle, dont le rôle au niveau de l'association Tax/NEMO dans notre mécanisme est à explorer.

Le nouveau modèle en deux étapes pour le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax, que nous avons établi à partir de nos recherches, permet donc une meilleure caractérisation de ce mécanisme, qui tient une place centrale dans l'activation de la voie NF- κ B. Cependant, différentes zones d'ombre subsistent, comme par exemple l'identification des E3 ligases de Tax, nécessitant par conséquent des études supplémentaires pour le préciser.

III.1. Un mécanisme à deux étapes, fonctionnant ensemble pour l'activation optimale du complexe IKK

L'une des interrogations soulevées dans le nouveau modèle établi de l'association de Tax au complexe IKK est de déterminer si les deux étapes mises en évidence se déroulent de façon concomitante ou s'il existe un timing qui les régule. Des expériences de co-immunoprécipitation de Tax, que nous avons réalisées de façon similaires à celles présentées dans les **FIGURES 63** et **64**, en présence ou non d'une construction codant pour une protéine HA-NEMO, permettent d'apporter des éléments de réponse à cette question.

En effet, les résultats obtenus montrent que la liaison entre Tax et HA-NEMO augmente l'interaction entre la protéine virale et le mutant TRAF5 DN, employé dans ces expériences. En outre, cette liaison entre Tax et HA-NEMO augmente également le recrutement d'IKK α et des formes phosphorylées d'IKK α et β , au niveau de Tax. Ces données suggèrent donc que l'association Tax/NEMO favorise l'interaction de TRAF5 avec la protéine virale, entraînant ainsi un recrutement important des sous-unités IKK α et β . Cependant, la liaison entre Tax et NEMO n'est pas un élément critique pour que la protéine virale recrute TRAF5, puisque grâce à des expériences de co-immunoprécipitation effectuées avec un mutant Tax-M22, qui a été décrit comme ne pouvant interagir avec la protéine NEMO (Harhaj and Sun, 1999), nous avons constaté que ce mutant de Tax pouvait tout de même se lier à TRAF5, induisant un recrutement d'IKK α et β , qui reste toutefois assez faible. Le mutant Tax-M22 étant, en outre, connu pour ne pas pouvoir activer la voie NF- κ B (Smith and Greene, 1990), ces résultats confirment que la liaison Tax/NEMO est nécessaire pour l'activation efficace du complexe IKK (Harhaj and Sun, 1999; Jin et al., 1999), en augmentant le recrutement de TRAF5 au niveau de la protéine virale, favorisant par conséquent celui des sous-unités IKK α et β .

Les deux étapes distinctes du mécanisme que nous avons mises en évidence semblent donc fonctionner ensemble et se potentialiser pour induire un recrutement et une activation optimale des composants du complexe IKK par Tax.

Des expériences supplémentaires doivent être entreprises afin de valider ces résultats, en utilisant par exemple des lignées de cellules MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) KO pour NEMO, qui ont été générées par l'équipe de Robert Weil et n'expriment plus de protéines NEMO endogènes. Grâce à ce modèle cellulaire, nous pourrions étudier l'interaction entre Tax et TRAF5 ainsi que le recrutement d'IKK α et β , en faisant abstraction des effets de NEMO.

III.2. Des interrogations persistent autour de la phosphorylation d'IKK α / β et de leur recrutement induit par TRAF5

A travers nos expériences de co-immunoprécipitations, nous avons prouvé que la protéine TRAF5 ne contribuait pas à l'activation par phosphorylation des sous-unités catalytiques IKK α et IKK β , suggérant notamment que TRAF5 n'induit pas le recrutement d'une protéine kinase au niveau du complexe Tax/IKK (**FIGURES 62, 63, 64 et 65**). Toutefois, nous avons montré que TRAF5 favorisait le recrutement d'IKK α et β , sous forme ou non phosphorylées, au niveau de Tax.

Une première hypothèse serait que TRAF5 recrute des protéines IKK α et β non phosphorylées qui seraient ensuite activées, grâce à un mécanisme de transphosphorylation ou grâce à leur phosphorylation par une kinase, comme TAK1, MEKK1 ou encore NIK, qui n'a pas encore été identifiée (Lavorgna and Harhaj, 2014). TRAF5 ne semblant pas être impliquée dans ce mécanisme de phosphorylation d'IKK α et β , il est possible que la kinase nécessaire à cette modification soit plutôt recrutée par l'enzyme E3 ligase responsable de l'ubiquitinylation de Tax à l'origine de son association avec NEMO (**FIGURE 67**). L'ubiquitine ligase TRAF6, potentielle candidate dans la conjugaison de Tax ainsi que de NEMO aux ubiquitines, notamment à des chaînes K63, a par ailleurs été décrite comme pouvant interagir avec différentes kinases, dont la protéine TAK1 et ses deux sous-unités régulatrices TAB1 et TAB2, induisant leur activation par ubiquitinylation (Adhikari et al., 2007; Skaug et al., 2009; Wang et al., 2001). Il serait donc intéressant de déterminer si, dans notre modèle, TRAF6 est nécessaire à la phosphorylation d'IKK α et β et quelle serait la kinase impliquée dans ce processus.

L'autre hypothèse est que TRAF5 recrute majoritairement des protéines IKK α et β sous forme phosphorylées. En effet, au niveau de nos expériences de co-immunoprécipitation (**FIGURES 63** et **64**), le calcul des ratios [IKK(α ou β)/Phospho-IKK α / β] dans les lysats ainsi que dans les co-immunoprécipitations de Tax montre que l'enzyme TRAF5 favorise le recrutement de sous-unités IKK α et IKK β déjà phosphorylées. Ce processus suggère donc, en amont, l'activation par Tax de kinases pouvant phosphoryler les sous-unités catalytiques, qui sont ensuite recrutées par TRAF5 au niveau de la protéine virale. Toutefois, des expériences supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer ces observations.

A l'heure actuelle, les deux hypothèses semblent plausibles et demandent de nouvelles recherches, afin de déterminer si TRAF5 induit préférentiellement le recrutement de formes d'IKK α et β préalablement activées par phosphorylation ou non, ce qui contribuerait à la précision de notre modèle.

III.3. Quelles sont les enzymes E2 et E3 associées à TRAF5 ?

L'identification de l'ubiquitine ligase associée à TRAF5 et responsable d'une partie de l'ubiquitinylation de Tax est l'une des questions majeures dans le modèle que nous avons établi. Les protéines TRAF étant connues pour fonctionner en oligomères, grâce à leur domaine TRAF caractéristique (Xie, 2013), il est possible que l'E3 ligase recrutée par TRAF5 soit un autre membre de cette famille.

Au laboratoire, nous avons étudié les protéines TRAF1 et TRAF2 et nous avons prouvé qu'elles avaient plutôt un effet inhibiteur sur l'ubiquitylation de Tax, en agissant de façon synergique lorsqu'elles étaient surexprimées. Des études ont par ailleurs montré que TRAF2 et TRAF6 n'intervenaient pas dans l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax (Geleziunas et al., 1998; Shibata et al., 2011).

Cependant, l'implication de TRAF6 dans ce mécanisme reste controversée puisqu'une autre étude a décrit que cette enzyme induisait l'ubiquitylation de Tax (Yu et al., 2008). De plus, la mise en évidence d'une interaction entre Tax et TRAF6, via un domaine bien identifié dans la séquence protéique de la protéine virale en C-terminal, ainsi que le rôle établi de cette E3 ligase dans l'ubiquitylation K63 de NEMO dans un contexte cytokinique notamment (Adhikari et al., 2007; Lavorgna and Harhaj, 2014; Skaug et al., 2009), suggèrent que la place de TRAF6 dans l'activation du complexe IKK par Tax doit faire l'objet de nouvelles recherches.

Il serait par ailleurs intéressant d'analyser l'implication de la protéine NRP dans notre modèle, pour voir si elle peut potentiellement être associée à TRAF5. Cette protéine a en effet été identifiée comme favorisant l'ubiquitylation de Tax, via le recrutement de la protéine TAX1BP1 (Journo et al., 2009b). En outre, Tax peut interagir avec NRP et NEMO, pour former un complexe localisé au niveau du compartiment périnucléaire (**FIGURE 51**). Des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence permettraient de mettre en évidence le possible recrutement de la protéine NRP par TRAF5 au niveau de Tax, mais également si ce mécanisme peut induire l'arrivée des sous-unités IKK α et β .

Une autre question importante est la détermination de l'enzyme E2, mise en jeu dans le modèle de formation du complexe Tax/IKK que nous avons proposé. Cette E2 doit en effet fonctionner avec l'E3 ligase associée à TRAF5 pour induire l'ubiquitylation de Tax, notamment avec des chaînes K63, entraînant ainsi le recrutement d'IKK α et β .

Dans le cas d'une activation cytokinique de la voie NF- κ B, les enzymes E2 Ubc13 et UbcH5 ont été caractérisées comme contribuant à l'ubiquitylation d'effecteurs, dont RIP1, TAK1 ou encore NEMO, nécessaire à l'activation de la voie de signalisation (Habelhah, 2010; Xie, 2013). Ces deux E2 pourraient donc éventuellement être impliquées dans notre modèle, et plus particulièrement l'enzyme Ubc13. En effet, une étude a mis en évidence le rôle direct d'Ubc13 dans l'ubiquitylation K63 de Tax, induisant son interaction avec NEMO (Shembade et al., 2007). Au laboratoire, nous avons souhaité étudier le rôle de cette E2 dans la formation du complexe Tax/IKK, afin de déterminer si elle participait à notre modèle.

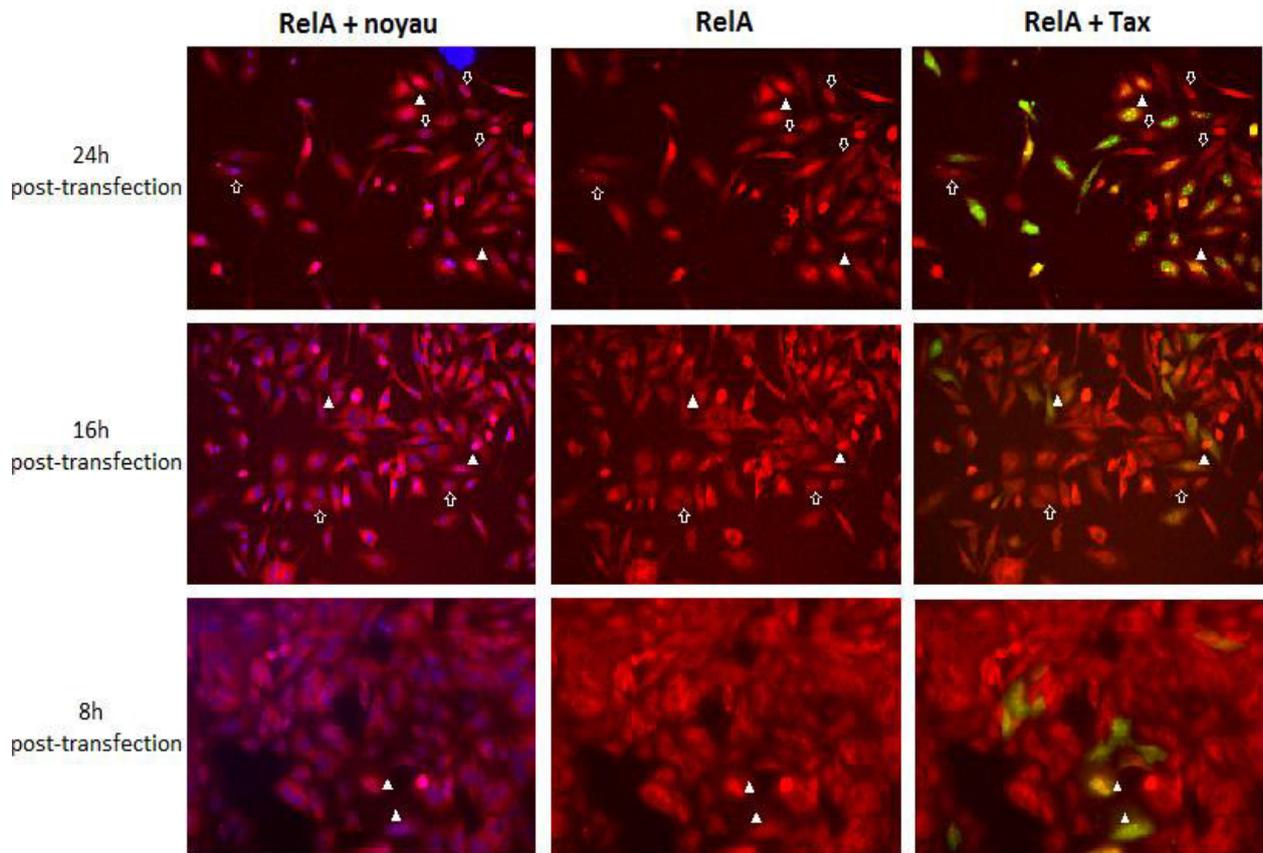


FIGURE 69 : L'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B s'accroît au cours du temps et peut biaiser nos analyses.

Visualisation de la translocation nucléaire de RelA dans des cellules adhérentes HeLa qui ont été préalablement transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Tax. Les marquages cellulaires ont été réalisés à différents temps post-transfection (8h, 16h ou 24h), afin d'évaluer la diminution de l'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B. La protéine Tax est marquée en vert, la protéine RelA en rouge et le noyau en bleu. Quelques-unes des cellules n'exprimant pas Tax mais ayant une translocation nucléaire de RelA, signe d'une activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B, sont indiquées par les flèches blanches. Les triangles blancs symbolisent certaines des cellules exprimant Tax et dans lesquelles RelA a été transloquée dans le noyau. Pour les marquages effectués 8h post-transfection, les images ont été prises avec un microscope à champs large ImageXpress micro XLS avec un objectif 20X, tandis que les images correspondant aux marquages réalisés 16h et 24h post-transfection ont été obtenues avec un microscope à champs large hermes avec un objectif 10X.

Nous avons donc réalisé des expériences de purification de Tax sur billes de nickel ainsi que des co-immunoprécipitations de Tax, en bloquant l'expression d'Ubc13 avec des siARN spécifiques ou en inhibant son activité catalytique avec un mutant inactif Ubc13 DN, muté au niveau d'une cystéine en position 87, qui est essentielle pour sa liaison aux chaînes d'ubiquitine K63 (Deng et al., 2000; Shembade et al., 2007). Que ce soit avec les siARN ou le mutant, les résultats obtenus ne sont malheureusement pas concluants. Par ailleurs, nous ne retrouvons pas la diminution de l'ubiquitinylation de Tax, lors du blocage d'Ubc13, constatée dans les analyses de (Shembade et al., 2007).

De nouvelles expériences, basées par exemple sur l'emploi de cellules MEF dans lesquelles l'expression du gène codant pour Ubc13 est répressible, qui ont été utilisées dans l'étude (Shembade et al., 2007), pourraient nous permettre d'analyser le rôle d'Ubc13 dans notre mécanisme.

III.4. L'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B, un élément à prendre en compte dans nos analyses

En collaboration avec l'équipe de Cécile Arriemerlou, nous avons mis au point des expériences d'immunofluorescence afin d'analyser l'effet de la protéine TRAF5 sur la translocation nucléaire de RelA, dans le cadre de notre modèle d'activation de la voie NF- κ B induite par Tax.

Bien que les résultats de ces expériences n'aient pas été concluants, elles nous ont permis de mettre en évidence l'impact de l'activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B dans nos études. En effet, lorsque nous avons réalisé les marquages cellulaires 24h post-transfection, nous avons observé un nombre important de cellules qui n'exprimaient pas Tax mais dans lesquelles la voie NF- κ B était activée, ce qui se traduisait par la translocation nucléaire de RelA (**FIGURE 69**). L'activation NF- κ B dans ces cellules, qui se situaient aux abords de cellules exprimant la protéine virale, s'explique très certainement par une stimulation cytokinique de cette voie de signalisation, notamment par du TNF α ou encore par des interleukines, produites massivement lors de l'activation de la voie NF- κ B induite par Tax dans les cellules exprimant la protéine virale. Cette stimulation cytokinique est donc une conséquence de l'activation NF- κ B primaire induite par Tax.

Par ailleurs, des études ont démontré que les cellules exprimant Tax peuvent également produire des protéines Tax solubles, capables d'activer la voie NF- κ B au niveau des cellules adjacentes, contribuant ainsi à cette activation secondaire (Alefantis et al., 2005b).

Nous avons alors effectué de nouvelles expériences, en réduisant le temps séparant les transfections des analyses, afin de limiter cette activation cytokinique secondaire de la voie NF- κ B, pour nous permettre d'effectuer au maximum nos études dans le cadre de l'activation primaire induite par Tax.

Avec les marquages réalisés 16h post-transfection, la stimulation secondaire est diminuée par rapport aux expériences menées 24h post-transfection, mais il reste toutefois des cellules n'exprimant pas Tax qui ont une translocation nucléaire de la protéine RelA (**FIGURE 69**). En revanche, en marquant les cellules 8h post-transfection, l'activation cytokinique de la voie NF- κ B est minime, permettant ainsi d'analyser uniquement l'activation primaire due à la protéine Tax (**FIGURE 69**).

Ces expériences soulèvent donc une question importante au niveau de nos analyses, mais qui peut aussi se poser plus généralement dans l'ensemble des études concernant l'activation de la voie NF- κ B par Tax. En effet, nous avons montré que l'activation que nous étudions dès 16h post-transfection correspond en réalité à une stimulation NF- κ B primaire associée à une stimulation secondaire due aux cytokines, qui s'accroît au cours du temps. Nous pouvons donc nous demander si les effets observés dans des expériences menées 24h, 48h ou encore 72h post-transfection ne concernent pas plutôt cette activation secondaire de la voie NF- κ B induite par les cytokines ou au contraire, s'ils ne sont pas biaisés par cette stimulation secondaire.

La protéine TRAF5 étant notamment impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF (Chen, 2012; Xie, 2013), il serait intéressant d'effectuer l'ensemble des expériences de purification de Tax sur billes de nickel, de co-immunoprécipitation ainsi que de transactivation que nous avons présentées, 8h après la transfection par exemple, afin de vérifier que le rôle de TRAF5, mis en évidence dans notre modèle, concerne l'activation primaire de la voie NF- κ B induite par Tax. Par ailleurs, l'utilisation d'un système *in vitro*, comme celui employé dans l'étude (Shibata et al., 2011), qui soulevait également cette question de la stimulation paracrine et autocrine de la voie NF- κ B, permettrait d'étudier l'implication de TRAF5 dans le cadre d'une activation primaire de la voie NF- κ B induite par la protéine Tax.

IV. CONCLUSION

Les recherches que j'ai menées au cours de mon doctorat contribuent à une meilleure connaissance du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B induit par la protéine Tax du virus HTLV-1, ainsi qu'à la caractérisation des rôles de la SUMOylation et de l'ubiquitinylation de cette protéine virale dans ce processus. Toutefois, de nombreuses interrogations subsistent encore, notamment dans le cadre du nouveau modèle de formation du complexe Tax/IKK que nous avons proposé, correspondant aux bases d'un mécanisme à étayer.

La résolution de ces questions et le décryptage précis de l'association entre Tax et les composants du complexe IKK apporteront des éléments cruciaux dans la compréhension de la pathogenèse des infections par HTLV-1. Il est également nécessaire d'élargir notre étude à un contexte d'infection *in vivo*, pour déterminer l'implication des relations entre Tax et les autres protéines virales, telles qu'HBZ, dans les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B ainsi que dans l'ensemble des processus conduisant à l'immortalisation et à la transformation cellulaire. Ces recherches pourront servir à l'élaboration de stratégies thérapeutiques adaptées, qui pourront potentiellement être étendues à d'autres cas de cancer, non dus à une infection par HTLV, et dans lesquels la dérégulation de la voie NF- κ B est souvent mise en jeu.

Bibliographie

A

- Adhikari, A., and Chen, Z.J. (2009). Diversity of polyubiquitin chains. *Dev. Cell* 16, 485–486.
- Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214–3226.
- Afonso, P.V., Ozden, S., Prevost, M.-C., Schmitt, C., Seilhean, D., Weksler, B., Couraud, P.-O., Gessain, A., Romero, I.A., and Ceccaldi, P.-E. (2007a). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2576–2583.
- Afonso, P.V., Zamborlini, A., Saïb, A., and Mahieux, R. (2007b). Centrosome and retroviruses: The dangerous liaisons. *Retrovirology* 4, 27.
- Afonso, P.V., Ozden, S., Cumont, M.-C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A., et al. (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000205.
- Afonso, P.V., Mekaouche, M., Mortreux, F., Toulza, F., Moriceau, A., Wattel, E., Gessain, A., Bangham, C.R.M., Dubreuil, G., Plumelle, Y., et al. (2010). Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* 116, 3802–3808.
- Ai, J., and Advani, A. (2015). Current status of antibody therapy in ALL. *Br. J. Haematol.* 168, 471–480.
- Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Egaña, I., Hjerpe, R., Fraser, P., Hay, R.T., Rodriguez, M.S., and Lang, V. (2012). Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize IκBα degradation and NF-κB activity. *PloS One* 7, e51672.
- Akagi, T., Ono, H., and Shimotohno, K. (1996). Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Oncogene* 12, 1645–1652.
- Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E.W., Grant, C., and Wigdahl, B. (2003). Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J. Biol. Chem.* 278, 21814–21822.
- Alefantis, T., Jain, P., Ahuja, J., Mostoller, K., and Wigdahl, B. (2005a). HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *J. Biomed. Sci.* 12, 961–974.
- Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C., and Wigdahl, B. (2005b). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J. Biol. Chem.* 280, 17353–17362.
- Alefantis, T., Flaig, K.E., Wigdahl, B., and Jain, P. (2007). Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 61, 194–200.
- Alexandre, C., and Verrier, B. (1991). Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* 6, 543–551.

- Andrade, D.O. de (2005). [Somatosensitive and motor evoked potentials in HTLV-I associated myelopathy]. *Arq. Neuropsiquiatr.* 63, 652–655.
- Andresen, V., Pise-Masison, C.A., Sinha-Datta, U., Bellon, M., Valeri, V., Washington Parks, R., Cecchinato, V., Fukumoto, R., Nicot, C., and Franchini, G. (2011). Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* 118, 1549–1559.
- Anupam, R., Doueiri, R., and Green, P.L. (2013). The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Front. Microbiol.* 4.
- Araújo, A.Q., Leite, A.C., Dultra, S.V., and Andrada-Serpa, M.J. (1995). Progression of neurological disability in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J. Neurol. Sci.* 129, 147–151.
- Arisawa, K., Soda, M., Endo, S., Kurokawa, K., Katamine, S., Shimokawa, I., Koba, T., Takahashi, T., Saito, H., Doi, H., et al. (2000). Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 85, 319–324.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J.Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y., and Shimotohno, K. (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* 19, 1491–1499.
- Arnulf, B., Villemain, A., Nicot, C., Mordelet, E., Charneau, P., Kersual, J., Zermati, Y., Mauviel, A., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2002). Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* 100, 4129–4138.
- Arpin-André, C., Laverdure, S., Barbeau, B., Gross, A., and Mesnard, J.-M. (2014). Construction of a reporter vector for analysis of bidirectional transcriptional activity of retrovirus LTR. *Plasmid* 74, 45–51.
- Asquith, B., Zhang, Y., Mosley, A.J., de Lara, C.M., Wallace, D.L., Worth, A., Kaftantzi, L., Meekings, K., Griffin, G.E., Tanaka, Y., et al. (2007). In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8035–8040.
- Au, P.-Y.B., and Yeh, W.-C. (2007). Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 32–47.
- Avesani, F., Romanelli, M.G., Turci, M., Di Gennaro, G., Sampaio, C., Bidoia, C., Bertazzoni, U., and Bex, F. (2010). Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF-κB activation. *Virology* 408, 39–48.
- Azakami, K., Sato, T., Araya, N., Utsunomiya, A., Kubota, R., Suzuki, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., et al. (2009). Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* 114, 3208–3215.

B

- Bai, X.T., Sinha-Datta, U., Ko, N.L., Bellon, M., and Nicot, C. (2012). Nuclear export and expression of human T-cell leukemia virus type 1 tax/rex mRNA are RxRE/Rex dependent. *J. Virol.* 86, 4559–4565.
- Banerjee, P., Crawford, L., Samuelson, E., and Feuer, G. (2010). Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology* 7, 8.
- Bangham, C.R.M., Meekings, K., Toulza, F., Nejmeddine, M., Majorovits, E., Asquith, B., and Taylor, G.P. (2009). The immune control of HTLV-1 infection: selection forces and dynamics. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 2889–2903.
- Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* 26, 89–98.
- Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2015). Does chronic infection in retroviruses have a sense? *Trends Microbiol.*
- Barnard, A.L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106, 988–995.
- Basbous, J., Bazarbachi, A., Granier, C., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2003). The central region of human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein contains distinct domains involved in subunit dimerization. *J. Virol.* 77, 13028–13035.
- Baud, V., and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372–377.
- Baydoun, H., Duc-Dodon, M., Lebrun, S., Gazzolo, L., and Bex, F. (2007). Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins Tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* 386, 191–201.
- Bazarbachi, A., El-Sabban, M.E., Nasr, R., Quignon, F., Awaraji, C., Kersual, J., Dianoux, L., Zermati, Y., Haidar, J.H., Hermine, O., 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. *Blood* 93, 278–283.
- Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Carlos Ramos, J., Tortevoeye, P., Otroock, Z., Taylor, G., Gessain, A., Harrington, W., Panelatti, G., and Hermine, O. (2010). Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 4177–4183.
- Beilke, M.A. (2012). Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 139–147.
- Belgnaoui, S.M., Fryrear, K.A., Nyalwidhe, J.O., Guo, X., and Semmes, O.J. (2010). The viral oncoprotein tax sequesters DNA damage response factors by tethering MDC1 to chromatin. *J. Biol. Chem.* 285, 32897–32905.

- Bellon, M., Baydoun, H.H., Yao, Y., and Nicot, C. (2010). HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* 115, 2441–2448.
- Béraud, C., and Greene, W.C. (1996). Interaction of HTLV-I Tax with the human proteasome: implications for NF-kappa B induction. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 13 Suppl 1, S76–S84.
- Berneman, Z.N., Gartenhaus, R.B., Reitz, M.S., Blattner, W.A., Manns, A., Hanchard, B., Ikehara, O., Gallo, R.C., and Klotman, M.E. (1992). Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3005–3009.
- Bertazzoni, U., Turci, M., Avesani, F., Di Gennaro, G., Bidoia, C., and Romanelli, M.G. (2011). Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses* 3, 541–560.
- Bettermann, K., Benesch, M., Weis, S., and Haybaeck, J. (2012). SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett.* 316, 113–125.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., and Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* 71, 3484–3497.
- Bex, F., Murphy, K., Wattiez, R., Burny, A., and Gaynor, R.B. (1999). Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation. *J. Virol.* 73, 738–745.
- Bidoia, C., Mazzorana, M., Pagano, M.A., Arrigoni, G., Meggio, F., Pinna, L.A., and Bertazzoni, U. (2010). The pleiotropic protein kinase CK2 phosphorylates HTLV-1 Tax protein in vitro, targeting its PDZ-binding motif. *Virus Genes* 41, 149–157.
- Biggar, R.J., Ng, J., Kim, N., Hisada, M., Li, H.-C., Cranston, B., Hanchard, B., and Maloney, E.M. (2006). Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* 193, 277–282.
- Bittencourt, A.L., and de Oliveira, M. de F.P. (2010). Cutaneous manifestations associated with HTLV-1 infection. *Int. J. Dermatol.* 49, 1099–1110.
- Bittencourt, A.L., da Graças Vieira, M., Brites, C.R., Farre, L., and Barbosa, H.S. (2007). Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. *Am. J. Clin. Pathol.* 128, 875–882.
- Bogerd, H.P., Huckaby, G.L., Ahmed, Y.F., Hanly, S.M., and Greene, W.C. (1991). The type I human T-cell leukemia virus (HTLV-I) Rex trans-activator binds directly to the HTLV-I Rex and the type 1 human immunodeficiency virus Rev RNA response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5704–5708.
- Bonnet, A., Randrianarison-Huetz, V., Nzounza, P., Nedelec, M., Chazal, M., Waast, L., Pene, S., Bazarbachi, A., Mahieux, R., Bénit, L., et al. (2012). Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* 9, 1–16.

Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5, 76.

Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Kettmann, R., and Willems, L. (2012). Interaction of HTLV-1 Tax with minichromosome maintenance proteins accelerates the replication timing program. *Blood* 119, 151–160.

Bradley, J.R., and Pober, J.S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482–6491.

Brady, J., Jeang, K.T., Duvall, J., and Khoury, G. (1987). Identification of p40x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* 61, 2175–2181.

Brauweiler, A., Garrus, J.E., Reed, J.C., and Nyborg, J.K. (1997). Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology* 231, 135–140.

Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22, 1707–1715.

Brites, C., Sampalo, J., and Oliveira, A. (2009). HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS Rev.* 11, 8–16.

Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y., and Ballard, D.W. (1995). Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2809–2818.

Burton, M., Upadhyaya, C.D., Maier, B., Hope, T.J., and Semmes, O.J. (2000). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J. Virol.* 74, 2351–2364.

C

Calattini, S., Chevalier, S.A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R., and Gessain, A. (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2, 30.

Calattini, S., Chevalier, S.A., Duprez, R., Afonso, P., Froment, A., Gessain, A., and Mahieux, R. (2006). Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3: Complete Nucleotide Sequence and Characterization of the Human Tax3 Protein. *J. Virol.* 80, 9876–9888.

Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S.A., Mahieux, R., Froment, A., and Gessain, A. (2009). New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J. Infect. Dis.* 199, 561–564.

Cao, S., Maldonado, J.O., Grigsby, I.F., Mansky, L.M., and Zhang, W. (2015). Analysis of human T-cell leukemia virus type 1 particles by using cryo-electron tomography. *J. Virol.* 89, 2430–2435.

- Carneiro-Proietti, A.B.F., Amaranto-Damasio, M.S., Leal-Horiguchi, C.F., Bastos, R.H.C., Seabra-Freitas, G., Borowiak, D.R., Ribeiro, M.A., Proietti, F.A., Ferreira, A.S.D., and Martins, M.L. (2014). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 3, S24–S29.
- Caron, C., Rousset, R., Béraud, C., Moncollin, V., Egly, J.M., and Jalinot, P. (1993). Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J.* 12, 4269–4278.
- Caron, C., Mengus, G., Dubrowskaya, V., Roisin, A., Davidson, I., and Jalinot, P. (1997). Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3662–3667.
- Cartier, L., and Ramirez, E. (2005). Presence of HTLV-I Tax protein in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Arch. Virol.* 150, 743–753.
- Casoli, C., Pilotti, E., and Bertazzoni, U. (2014). Proviral load determination of HTLV-1 and HTLV-2 in patients' peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1087, 315–323.
- Cassar, O., Capuano, C., Bassot, S., Charavay, F., Duprez, R., Afonso, P.V., Abel, M., Walter, H., Mera, W., Martin, P.M.V., et al. (2007). Human T lymphotropic virus type 1 subtype C melanesian genetic variants of the Vanuatu Archipelago and Solomon Islands share a common ancestor. *J. Infect. Dis.* 196, 510–521.
- Cavrois, M., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Plumelle, Y., and Wattel, E. (1996). Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88, 4646–4650.
- Cavrois, M., Leclercq, I., Gout, O., Gessain, A., Wain-Hobson, S., and Wattel, E. (1998). Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. *Oncogene* 17, 77–82.
- Cavrois, M., Gessain, A., Gout, O., Wain-Hobson, S., and Wattel, E. (2000). Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J. Infect. Dis.* 182, 1044–1050.
- Ceccaldi, P.-E., Delebecque, F., Prevost, M.-C., Moris, A., Abastado, J.-P., Gessain, A., Schwartz, O., and Ozden, S. (2006). DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 80, 4771–4780.
- Chandhasin, C., Ducu, R.I., Berkovich, E., Kastan, M.B., and Marriott, S.J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *J. Virol.* 82, 6952–6961.
- Chang, T.-P., and Vancurova, I. (2013). NFκB function and regulation in cutaneous T-cell lymphoma. *Am. J. Cancer Res.* 3, 433–445.

- Chaturvedi, M.M., Sung, B., Yadav, V.R., Kannappan, R., and Aggarwal, B.B. (2011). NF- κ B addiction and its role in cancer: “one size does not fit all.” *Oncogene* 30, 1615–1630.
- Chavance, M., Fréry, N., Valette, I., Monplaisir, N., and Schaffar, L. (1989). Cohort effect of HTLV-I seroprevalence in southern Japan. *Lancet* 2, 1337.
- Cheab, B., Auguste, A., and Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin. J. Cancer* 34, 4–16.
- Chen, Z.J. (2012). Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* 246, 95–106.
- Chen, Z.J., and Sun, L.J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell* 33, 275–286.
- Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L.C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J., et al. (2006). Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T cell leukemia cells. *Int. Immunol.* 18, 269–277.
- Chen, S., Yu, X., Lei, Q., Ma, L., and Guo, D. (2013). The SUMOylation of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) by Ubc9 regulates its stability and transcriptional repression activity. *J. Cell. Biochem.* 114, 2323–2333.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9, 1586–1597.
- Cheng, H., Ren, T., and Sun, S. (2012). New insight into the oncogenic mechanism of the retroviral oncoprotein Tax. *Protein Cell* 3, 581–589.
- Chevalier, S.A., Durand, S., Dasgupta, A., Radonovich, M., Cimarelli, A., Brady, J.N., Mahieux, R., and Pise-Masison, C.A. (2012). The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PloS One* 7, e41003.
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Chopin, C., Bex, F., and Pique, C. (2004). Stable Ubiquitination of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *J. Virol.* 78, 11823–11832.
- Ching, Y.-P., Chan, S.-F., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat. Cell Biol.* 8, 717–724.
- Chlichlia, K., and Khazaie, K. (2010). HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem. Biol. Interact.* 188, 359–365.
- Cho, W.-K., Zhou, M., Jang, M.K., Huang, K., Jeong, S.-J., Ozato, K., and Brady, J.N. (2007). Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *J. Virol.* 81, 11179–11186.

- Choi, Y.B., and Harhaj, E.W. (2014a). Functional implications of mitochondrial reactive oxygen species generated by oncogenic viruses. *Front. Biol.* *9*, 423–436.
- Choi, Y.B., and Harhaj, E.W. (2014b). HTLV-1 tax stabilizes MCL-1 via TRAF6-dependent K63-linked polyubiquitination to promote cell survival and transformation. *PLoS Pathog.* *10*, e1004458.
- Choudhary, G., and Ratner, L. (2011). The HTLV-1 hbx antisense gene indirectly promotes tax expression via down-regulation of p30(II) mRNA. *Virology* *410*, 307–315.
- Chu, Z.-L., DiDonato, J.A., Hawiger, J., and Ballard, D.W. (1998). The Tax Oncoprotein of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Associates with and Persistently Activates I κ B Kinases Containing IKK α and IKK β . *J. Biol. Chem.* *273*, 15891–15894.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., and Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* *115*, 679–688.
- Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol.* *14*, 103–106.
- Ciminale, V., Pavlakis, G.N., Derse, D., Cunningham, C.P., and Felber, B.K. (1992). Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *J. Virol.* *66*, 1737–1745.
- Ciminale, V., D'Agostino, D.M., Zotti, L., Franchini, G., Felber, B.K., and Chieco-Bianchi, L. (1995). Expression and characterization of proteins produced by mRNAs spliced into the X region of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type II. *Virology* *209*, 445–456.
- Ciminale, V., Zotti, L., D'Agostino, D.M., Ferro, T., Casareto, L., Franchini, G., Bernardi, P., and Chieco-Bianchi, L. (1999). Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Oncogene* *18*, 4505–4514.
- Clemens, K.E., Piras, G., Radonovich, M.F., Choi, K.S., Duvall, J.F., DeJong, J., Roeder, R., and Brady, J.N. (1996). Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4656–4664.
- Cook, L.B., Rowan, A.G., Melamed, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* *120*, 3488–3490.
- Cook, L.B., Elemans, M., Rowan, A.G., and Asquith, B. (2013). HTLV-1: Persistence and pathogenesis. *Virology* *435*, 131–140.
- Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., and Bangham, C.R.M. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *123*, 3925–3931.
- Cooper, S.A., van der Loeff, M.S., and Taylor, G.P. (2009). The neurology of HTLV-1 infection. *Pract. Neurol.* *9*, 16–26.

Couroucé, A.M., Pillonel, J., Lemaire, J.M., and Saura, C. (1998). HTLV testing in blood transfusion. *Vox Sang.* 74 Suppl 2, 165–169.

Cubeñas-Potts, C., and Matunis, M.J. (2013). SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Dev. Cell* 24, 1–12.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 184–192.

Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., and Kashanchi, F. (2012). HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways. *Front. Microbiol.* 3.

D

D'Agostino, D.M., Ranzato, L., Arrigoni, G., Cavallari, I., Belleudi, F., Torrisi, M.R., Silic-Benussi, M., Ferro, T., Petronilli, V., Marin, O., et al. (2002). Mitochondrial alterations induced by the p13II protein of human T-cell leukemia virus type 1. Critical role of arginine residues. *J. Biol. Chem.* 277, 34424–34433.

Dassouki, Z., Sahin, U., El Hajj, H., Jollivet, F., Kfoury, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Hermine, O., de Thé, H., and Bazarbachi, A. (2015). ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. *Blood* 125, 474–482.

Dayaram, T., Lemoine, F.J., Donehower, L.A., and Marriott, S.J. (2013). Activation of WIP1 phosphatase by HTLV-1 Tax mitigates the cellular response to DNA damage. *PloS One* 8, e55989.

De Castro-Costa, C.M., Araújo, A.Q.C., Barreto, M.M., Takayanagui, O.M., Sohler, M.P., da Silva, E.L.M., de Paula, S.M.B., Ishak, R., Ribas, J.G.R., Roviroso, L.C., et al. (2006). Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 931–935.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351–361.

Derse, D., Mikovits, J., and Ruscetti, F. (1997). X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro. *Virology* 237, 123–128.

Desdouits, M., Cassar, O., Maisonobe, T., Desrames, A., Aouba, A., Hermine, O., Mikol, J., Polivka, M., Penisson-Besnier, I., Marcorelles, P., et al. (2011). Immunohistochemical and virological features of HTLV-1-associated myosites: a study of 13 patients from West Indies and Africa. *Retrovirology* 8, A41.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* 2, 233–239.

De Thé, G., and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 381–386.

- Devergne, O., McFarland, E.C., Mosialos, G., Izumi, K.M., Ware, C.F., and Kieff, E. (1998). Role of the TRAF Binding Site and NF- κ B Activation in Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1-Induced Cell Gene Expression. *J. Virol.* 72, 7900–7908.
- De Vries, E.G.E. (2006). Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications. *Clin. Cancer Res.* 12, 2390–2393.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Dodon, M.D., Li, Z., Hamaia, S., and Gazzolo, L. (2004). Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J. Gen. Virol.* 85, 1921–1932.
- Dooneief, G., Marlink, R., Bell, K., Marder, K., Renjifo, B., Stern, Y., and Mayeux, R. (1996). Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology* 46, 1556–1560.
- Doultree, J.C., Kiernan, R.E., Lee, J.Y., Bowden, D.S., McPhee, D.A., Tokuyasu, K.T., and Marshall, J.A. (1992). A new electron microscope positive staining method for viruses in suspension. *J. Virol. Methods* 37, 321–335.
- Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* 416, 1–8.
- Durkin, S.S., Ward, M.D., Fryrear, K.A., and Semmes, O.J. (2006). Site-specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 281, 31705–31712.

E

- Easley, R., Carpio, L., Guendel, I., Klase, Z., Choi, S., Kehn-Hall, K., Brady, J.N., and Kashanchi, F. (2010). Human T-lymphotropic virus type 1 transcription and chromatin-remodeling complexes. *J. Virol.* 84, 4755–4768.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., Castro-Amarante, M.F. de, Buchmann, C., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2011). Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in HTLV-1 Infection and Persistence. *Viruses* 3, 861–885.
- El-Sabban, M.E., Nasr, R., Dbaibo, G., Hermine, O., Abboushi, N., Quignon, F., Ameisen, J.C., Bex, F., de Thé, H., and Bazarbachi, A. (2000). Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation. *Blood* 96, 2849–2855.
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* 121, 761–770.
- Etoh, K., Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. (1997). Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res.* 57, 4862–4867.

Evangelisti, C., Evangelisti, C., Chiarini, F., Lonetti, A., Buontempo, F., Bressanin, D., Cappellini, A., Orsini, E., McCubrey, J.A., and Martelli, A.M. (2014). Therapeutic potential of targeting mTOR in T-cell acute lymphoblastic leukemia (review). *Int. J. Oncol.* *45*, 909–918.

F

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

Feigal, E., Murphy, E., Vranizan, K., Bacchetti, P., Chaisson, R., Drummond, J.E., Blattner, W., McGrath, M., Greenspan, J., and Moss, A. (1991). Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *J. Infect. Dis.* *164*, 36–42.

Felipe, L., Gonçalves, D.U., Santos, M.A.R., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Carneiro-Proietti, A.B., and Lambertucci, J.R. (2008). Vestibular-evoked myogenic potential (VEMP) to evaluate cervical myelopathy in human T-cell lymphotropic virus type I infection. *Spine* *33*, 1180–1184.

Feng, X., and Ratner, L. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon alpha. *Virology* *374*, 210–216.

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* *319*, 1096–1100.

Fenzia, C., Focchi, M., Jones, K., Parks, R.W., Ceribelli, M., Chevalier, S.A., Edwards, D., Ruscetti, F., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2014). Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 p30, but not p12/p8, counteracts toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 signaling in human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.* *88*, 393–402.

Feuer, G., and Green, P.L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* *24*, 5996–6004.

Filippone, C., Bassot, S., Betsem, E., Tortevoeye, P., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O., Plancoulaine, S., Calattini, S., and Gessain, A. (2012). A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 1663–1672.

Filippone, C., Betsem, E., Tortevoeye, P., Cassar, O., Bassot, S., Froment, A., Fontanet, A., and Gessain, A. (2015). A Severe Bite From a Nonhuman Primate is a Major Risk Factor for HTLV-1 Infection in Hunters From Central Africa. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*

Fogarty, K.H., Zhang, W., Grigsby, I.F., Johnson, J.L., Chen, Y., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2011a). New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses* *3*, 770–793.

Fogarty, K.H., Chen, Y., Grigsby, I.F., Macdonald, P.J., Smith, E.M., Johnson, J.L., Rawson, J.M., Mansky, L.M., and Mueller, J.D. (2011b). Characterization of cytoplasmic Gag-gag interactions by dual-color z-scan fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* *100*, 1587–1595.

Fryrear, K.A., Durkin, S.S., Gupta, S.K., Tiedebohl, J.B., and Semmes, O.J. (2009). Dimerization and a novel Tax speckled structure localization signal are required for Tax nuclear localization. *J. Virol.* 83, 5339–5352.

Fryrear, K.A., Guo, X., Kerscher, O., and Semmes, O.J. (2012). The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* 119, 1173–1181.

Fu, J., Qu, Z., Yan, P., Ishikawa, C., Aqeilan, R.I., Rabson, A.B., and Xiao, G. (2011). The tumor suppressor gene WWOX links the canonical and noncanonical NF- κ B pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Blood* 117, 1652–1661.

Fukuda, R.-I., Tsuchiya, K., Suzuki, K., Itoh, K., Fujita, J., Utsunomiya, A., and Tsuji, T. (2012). HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF- κ B pathway. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 95–104.

Fukumoto, R. (2013). Human T-lymphotropic virus type 1 non-structural proteins: Requirements for latent infection. *Cancer Sci.* 104, 983–988.

G

Gabet, A.S., Mortreux, F., Talarmin, A., Plumelle, Y., Leclercq, I., Leroy, A., Gessain, A., Clity, E., Joubert, M., and Wattel, E. (2000). High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene* 19, 4954–4960.

Gabet, A.-S., Mortreux, F., Charneau, P., Riou, P., Duc-Dodon, M., Wu, Y., Jeang, K.-T., and Wattel, E. (2003). Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* 22, 3734–3741.

Gasmi, M., Farouqi, B., d' Incan, M., and Desgranges, C. (1994). Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1313–1315.

Gatza, M.L., and Marriott, S.J. (2006). Genotoxic stress and cellular stress alter the subcellular distribution of human T-cell leukemia virus type 1 tax through a CRM1-dependent mechanism. *J. Virol.* 80, 6657–6668.

Gatza, M.L., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2007). Ubiquitination of HTLV-I Tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* 4, 95.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J. Virol.* 76, 12813–12822.

Gautheron, J., and Courtois, G. (2010). “Without Ub I am nothing”: NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 3101–3113.

- Gazon, H., Lemasson, I., Polakowski, N., Césaire, R., Matsuoka, M., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Peloponese, J.-M. (2012). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) bZIP Factor Requires Cellular Transcription Factor JunD To Upregulate HTLV-1 Antisense Transcription from the 3' Long Terminal Repeat. *J. Virol.* *86*, 9070–9078.
- Geleziunas, R., Ferrell, S., Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E.T., Grant, M., Connelly, M.A., Hambor, J.E., Marcu, K.B., and Greene, W.C. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF- κ B involves activation of the I κ B kinase α (IKK α) and IKK β cellular kinases. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5157–5165.
- Gerondakis, S., Fulford, T.S., Messina, N.L., and Grumont, R.J. (2013). NF- κ B control of T cell development. *Nat. Immunol.* *15*, 15–25.
- Gessain, A. (2011). [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. *Bull. Société Pathol. Exot.* *104*, 167–180.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* *3*, 388.
- Gessain, A., and Gout, O. (1992). Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann. Intern. Med.* *117*, 933–946.
- Gessain, A., and Mahieux, R. (2000). [Epidemiology, origin and genetic diversity of HTLV-1 retrovirus and STLV-1 simian affiliated retrovirus]. *Bull. Société Pathol. Exot.* *93*, 163–171.
- Gessain, A., and Mahieux, R. (2012). Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev. Neurol. (Paris)* *168*, 257–269.
- Gessain, A., and de Thé, G. (1996). Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLV-PP, and PTLV-L. *Adv. Virus Res.* *47*, 377–426.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de Thé, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* *2*, 407–410.
- Gessain, A., Saal, F., Giron, M.L., Lasneret, J., Lagaye, S., Gout, O., De Thé, G., Sigaux, F., and Peries, J. (1990). Cell surface phenotype and human T lymphotropic virus type 1 antigen expression in 12 T cell lines derived from peripheral blood and cerebrospinal fluid of West Indian, Guyanese and African patients with tropical spastic paraparesis. *J. Gen. Virol.* *71* (Pt 2), 333–341.
- Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.* *66*, 2288–2295.
- Gessain, A., Rua, R., Betssem, E., Turpin, J., and Mahieux, R. (2013). HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology* *435*, 187–199.

- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., et al. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* *80*, 6844–6854.
- Ghorbel, S., Sinha-Datta, U., Dunder, M., Brown, M., Franchini, G., and Nicot, C. (2006). Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* *281*, 37150–37158.
- Gilden, R.V., Long, C.W., Hanson, M., Toni, R., Charman, H.P., Oroszlan, S., Miller, J.M., and Maaten, M.J.V.D. (1975). Characteristics of the Major Internal Protein and RNA-Dependent DNA Polymerase of Bovine Leukaemia Virus. *J. Gen. Virol.* *29*, 305–314.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 536–541.
- Gillet, N., Kettmann, R., and Willems, L. (2007). Homologies entre les deux rétrovirus BLV et HTLV-1 et développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur la levée de la latence virale. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* *11*, 151–157.
- Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* *117*, 3113–3122.
- Girdwood, D.W.H., Tatham, M.H., and Hay, R.T. (2004). SUMO and transcriptional regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 201–210.
- Giri, A., Markham, P., Digilio, L., Hurteau, G., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1994). Isolation of a novel simian T-cell lymphotropic virus from *Pan paniscus* that is distantly related to the human T-cell leukemia/lymphotropic virus types I and II. *J. Virol.* *68*, 8392–8395.
- Gitlin, S.D., Lindholm, P.F., Marriott, S.J., and Brady, J.N. (1991). Transdominant human T-cell lymphotropic virus type I TAX1 mutant that fails to localize to the nucleus. *J. Virol.* *65*, 2612–2621.
- Gohda, J., Irisawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ohtani, K., Fujisawa, J., and Inoue, J. (2007). HTLV-1 Tax-induced NFkappaB activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *357*, 225–230.
- Goncalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araujo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* *23*, 577–589.
- Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L.S., and Yeh, E.T. (1997). Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J. Biol. Chem.* *272*, 28198–28201.
- Goren, I., Semmes, O.J., Jeang, K.T., and Moelling, K. (1995). The amino terminus of Tax is required for interaction with the cyclic AMP response element binding protein. *J. Virol.* *69*, 5806–5811.

- Gotuzzo, E., Cabrera, J., Deza, L., Verdonck, K., Vandamme, A.-M., Cairampoma, R., Vizcarra, D., Cabada, M., Narvarde, G., and De las Casas, C. (2004). Clinical characteristics of patients in Peru with human T cell lymphotropic virus type 1-associated tropical spastic paraparesis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *39*, 939–944.
- Goubau, P., Van Brussel, M., Vandamme, A.M., Liu, H.F., and Desmyter, J. (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*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 2848–2852.
- Gout, O., Baulac, M., Gessain, A., Semah, F., Saal, F., Périès, J., Cabrol, C., Foucault-Fretz, C., Laplane, D., and Sigaux, F. (1990). Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* *322*, 383–388.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59–72.
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., and Ramstedt, U. (1992). Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.* *66*, 4570–4575.
- Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K.-T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* *24*, 5976–5985.
- Green, P.L., and Chen, I.S. (1990). Regulation of human T cell leukemia virus expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *4*, 169–175.
- Grigsby, I.F., Zhang, W., Johnson, J.L., Fogarty, K.H., Chen, Y., Rawson, J.M., Crosby, A.J., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2010). Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology* *7*, 75.
- Gröne, M., Koch, C., and Grassmann, R. (1996). The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation. *Virology* *218*, 316–325.
- Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1057–1061.
- Grulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., and Vajdic, C.M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* *370*, 59–67.
- Guo, X., Baillo, A., Dutta, S.M., Kerscher, O., and Semmes, O.J. (2014). HTLV-1 Tax binds to and stabilizes the SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 during DNA damage response. *Retrovirology* *11*, P98.
- Gutiérrez, G., Rodríguez, S.M., de Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., Jaworski, J.-P., Alvarez, I., Vagnoni, L., Trono, K., et al. (2014). Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses* *6*, 2416–2427.

H

- Ha, H., Han, D., and Choi, Y. (2009). TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan *Chapter 11*, Unit 11.9D.
- Habelhah, H. (2010). Emerging complexity of protein ubiquitination in the NF- κ B pathway. *Genes Cancer* *1*, 735–747.
- Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S., and Shida, H. (1998). Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* *72*, 6602–6607.
- Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K.-T., and Grassmann, R. (2002). Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3327–3338.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Hay, D.C. (2010). Post-translational modification by SUMO. *Toxicology* *278*, 288–293.
- Hanon, E., Stinchcombe, J.C., Saito, M., Asquith, B.E., Taylor, G.P., Tanaka, Y., Weber, J.N., Griffiths, G.M., and Bangham, C.R. (2000). Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* *13*, 657–664.
- Harhaj, E.W., and Dixit, V.M. (2012). Regulation of NF- κ B by deubiquitinases. *Immunol. Rev.* *246*, 107–124.
- Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (1999). IKK γ serves as a docking subunit of the I κ B kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 22911–22914.
- Harhaj, N.S., Sun, S.-C., and Harhaj, E.W. (2006). Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization of I κ B Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 4185–4192.
- Harrod, R., Tang, Y., Nicot, C., Lu, H.S., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (1998). An exposed KID-like domain in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5052–5061.
- Harrod, R., Kuo, Y.L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (2000). p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J. Biol. Chem.* *275*, 11852–11857.
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., et al. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* *12*, 466–472.
- Hasegawa, H., Yamada, Y., Tsukasaki, K., Mori, N., Tsuruda, K., Sasaki, D., Usui, T., Osaka, A., Atogami, S., Ishikawa, C., et al. (2011). LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. *Leukemia* *25*, 575–587.

- Hayakawa, M. (2012). Role of K63-linked polyubiquitination in NF- κ B signalling: which ligase catalyzes and what molecule is targeted? *J. Biochem. (Tokyo)* *151*, 115–118.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* *26*, 203–234.
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.* *281*, 16117–16127.
- Heidecker, G., Lloyd, P.A., Fox, K., Nagashima, K., and Derse, D. (2004). Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J. Virol.* *78*, 6636–6648.
- Hermine, O., Dombret, H., Poupon, J., Arnulf, B., Lefrère, F., Rousselot, P., Damaj, G., Delarue, R., Femand, J.P., Brouet, J.C., et al. (2004). Phase II trial of arsenic trioxide and alpha interferon in patients with relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* *5*, 130–134.
- Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M., and Seiki, M. (1988). Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* *7*, 519–523.
- Hieshima, K., Nagakubo, D., Nakayama, T., Shirakawa, A.-K., Jin, Z., and Yoshie, O. (2008). Tax-inducible production of CC chemokine ligand 22 by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells promotes preferential transmission of HTLV-1 to CCR4-expressing CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 931–939.
- Higuchi, M., and Fujii, M. (2009). Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* *6*, 117.
- Higuchi, M., Tsubata, C., Kondo, R., Yoshida, S., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Mahieux, R., Matsuoka, M., and Fujii, M. (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*, 11900–11907.
- Hino, S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *87*, 152–166.
- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K.I., Shirakawa, S., and Miyoshi, I. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 6476–6480.
- Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Inoue, J., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3584–3588.
- Hirata, A., Higuchi, M., Niinuma, A., Ohashi, M., Fukushi, M., Oie, M., Akiyama, T., Tanaka, Y., Gejyo, F., and Fujii, M. (2004). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* *318*, 327–336.

- Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N., and 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.
- Hishizawa, M., Kanda, J., Utsunomiya, A., Taniguchi, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Tanosaki, R., Kawano, F., Miyazaki, Y., Masuda, M., et al. (2010). Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood* *116*, 1369–1376.
- Hjelle, B., Appenzeller, O., Mills, R., Alexander, S., Torrez-Martinez, N., Jahnke, R., and Ross, G. (1992). Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* *339*, 645–646.
- Hochstrasser, M. (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat. Cell Biol.* *2*, E153–E157.
- Hodson, A., Crichton, S., Montoto, S., Mir, N., Matutes, E., Cwynarski, K., Kumaran, T., Ardeshta, K.M., Pagliuca, A., Taylor, G.P., et al. (2011). Use of zidovudine and interferon alfa with chemotherapy improves survival in both acute and lymphoma subtypes of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4696–4701.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 7276–7280.
- Hoshino, H. (2012). Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. *Front. Microbiol.* *3*, 222.
- Hoxie, J.A., Matthews, D.M., and Cines, D.B. (1984). Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 7591–7595.
- Huang, K., and Fingar, D.C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 79–90.
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y., and Cheng, H. (2009). HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* *284*, 6208–6217.
- Huang, Y., Ohtani, K., Iwanaga, R., Matsumura, Y., and Nakamura, M. (2001). Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* *20*, 1094–1102.

I

- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* *299*, 1713–1716.

Ikezoe, T., Nishioka, C., Bandobashi, K., Yang, Y., Kuwayama, Y., Adachi, Y., Takeuchi, T., Koeffler, H.P., and Taguchi, H. (2007). Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk. Res.* 31, 673–682.

Inoue, J. i, Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 14–24.

Ishida, T., Hishizawa, M., Kato, K., Tanosaki, R., Fukuda, T., Takatsuka, Y., Eto, T., Miyazaki, Y., Hidaka, M., Uike, N., et al. (2013). Impact of graft-versus-host disease on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 19, 1731–1739.

Ishitsuka, K., and Tamura, K. (2014). Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet Oncol.* 15, e517–e526.

Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000158.

Itoyama, T., Sadamori, N., Tokunaga, S., Sasagawa, I., Nakamura, H., Yao, E., Jubashi, T., Yamada, Y., Ikeda, S., and Ichimaru, M. (1990). Cytogenetic studies of human T-cell leukemia virus type I carriers. A family study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 49, 157–163.

Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* 279, 38–46.

Iwanaga, M., Watanabe, T., Utsunomiya, A., Okayama, A., Uchimaru, K., Koh, K.-R., Ogata, M., Kikuchi, H., Sagara, Y., Uozumi, K., 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. *Blood* 116, 1211–1219.

Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T., and Nakamura, M. (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 20, 2055–2067.

Izumo, S. (2010). Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.*

Izumo, S., Goto, I., Itoyama, Y., Okajima, T., Watanabe, S., Kuroda, Y., Araki, S., Mori, M., Nagataki, S., Matsukura, S., et al. (1996). Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46, 1016–1021.

J

Jain, P., Mostoller, K., Flaig, K.E., Ahuja, J., Lepoutre, V., Alefantis, T., Khan, Z.K., and Wigdahl, B. (2007). Identification of human T cell leukemia virus type 1 tax amino acid signals and cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 282, 34581–34593.

- Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J. Virol.* 83, 10908–10921.
- Javier, R.T., and Butel, J.S. (2008). The History of Tumor Virology. *Cancer Res.* 68, 7693–7706.
- Jeang, K.T., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M., and Khoury, G. (1988). Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J. Virol.* 62, 4499–4509.
- Jeang, K.T., Widen, S.G., Semmes, O.J., and Wilson, S.H. (1990). HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* 247, 1082–1084.
- Jeong, S.-J., Radonovich, M., Brady, J.N., and Pise-Masison, C.A. (2004). HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity. *Blood* 104, 1490–1497.
- Jeong, S.-J., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Park, H.U., and Brady, J.N. (2005a). Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* 24, 6719–6728.
- Jeong, S.-J., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Park, H.U., and Brady, J.N. (2005b). A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 280, 10326–10332.
- Jeong, S.-J., Ryo, A., and Yamamoto, N. (2009). The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 294–299.
- Jiang, H., Lu, H., Schiltz, R.L., Pise-Masison, C.A., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., and Brady, J.N. (1999). PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8136–8145.
- Jin, D.Y., and Jeang, K.T. (1997). HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res.* 25, 379–387.
- Jin, D.Y., Teramoto, H., Giam, C.Z., Chun, R.F., Gutkind, J.S., and Jeang, K.T. (1997). A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 25816–25823.
- Jin, D.-Y., Spencer, F., and Jeang, K.-T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* 93, 81–91.
- Jin, D.Y., Giordano, V., Kibler, K.V., Nakano, H., and Jeang, K.T. (1999). Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J. Biol. Chem.* 274, 17402–17405.
- Jin, J., Sherer, N.M., Heidecker, G., Derse, D., and Mothes, W. (2009a). Assembly of the murine leukemia virus is directed towards sites of cell-cell contact. *PLoS Biol.* 7, e1000163.

- Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A.-K., Nakayama, T., Shigeta, A., Hieshima, K., Yamada, Y., and Yoshie, O. (2009b). CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int. J. Cancer* *125*, 2229–2235.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* *102*, 549–552.
- Johnson, J.M., Nicot, C., Fullen, J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J.C., Jacobson, S., and Franchini, G. (2001). Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J. Virol.* *75*, 6086–6094.
- Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M., and Sattentau, Q.J. (2004). HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* *199*, 283–293.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., and Ruscetti, F.W. (2005). Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J. Virol.* *79*, 12692–12702.
- Jones, K.S., Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D.C., Lisinski, I., Cushman, S.W., Jacobson, S., and Ruscetti, F.W. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J. Virol.* *80*, 8291–8302.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* *14*, 429–436.
- Jones, K.S., Lambert, S., Bouttier, M., Bénit, L., Ruscetti, F.W., Hermine, O., and 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.
- Journo, C., and Mahieux, R. (2011). HTLV-1 and innate immunity. *Viruses* *3*, 1374–1394.
- Journo, C., Douceron, E., and Mahieux, R. (2009a). HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol.* *4*, 425–440.
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., et al. (2009b). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* *5*, e1000521.
- Journo, C., Bonnet, A., Favre-Bonvin, A., Turpin, J., Vinera, J., Côté, E., Chevalier, S.A., Kfoury, Y., Bazarbachi, A., Pique, C., et al. (2013). Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J. Virol.* *87*, 1123–1136.
- Ju, W., Zhang, M., Petrus, M., Maeda, M., Pise-Masison, C.A., and Waldmann, T.A. (2014). Combination of 9-aminoacridine with Campath-1H provides effective therapy for a murine model of adult T-cell leukemia. *Retrovirology* *11*, 43.

K

- Kajiyama, W., Kashiwagi, S., Ikematsu, H., Hayashi, J., Nomura, H., and Okochi, K. (1986). Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J. Infect. Dis.* *154*, 851–857.
- Kannian, P., and Green, P.L. (2010). Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* *2*, 2037–2077.
- Kannian, P., Yin, H., Doueiri, R., Lairmore, M.D., Fernandez, S., and Green, P.L. (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. *J. Virol.* *86*, 3757–3766.
- Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* *73*, 4299–4304.
- Kaplan, J.E., Litchfield, B., Rouault, C., Lairmore, M.D., Luo, C.C., Williams, L., Brew, B.J., Price, R.W., Janssen, R., and Stoneburner, R. (1991). HTLV-I-associated myelopathy associated with blood transfusion in the United States: epidemiologic and molecular evidence linking donor and recipient. *Neurology* *41*, 192–197.
- Kasper, C.A., Sorg, I., Schmutz, C., Tschon, T., Wischnewski, H., Kim, M.L., and Arrieumerlou, C. (2010). Cell-cell propagation of NF- κ B transcription factor and MAP kinase activation amplifies innate immunity against bacterial infection. *Immunity* *33*, 804–816.
- Kawakami, A., Nakashima, T., Sakai, H., Urayama, S., Yamasaki, S., Hida, A., Tsuboi, M., Nakamura, H., Ida, H., Migita, K., et al. (1999). Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* *94*, 3847–3854.
- Kazanji, M., Mouinga-Ondémé, A., Lekana-Douki-Etenna, S., Caron, M., Makuwa, M., Mahieux, R., and Gessain, A. (2015). Origin of HTLV-1 in hunters of nonhuman primates in Central Africa. *J. Infect. Dis.* *211*, 361–365.
- Kchour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H., et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* *113*, 6528–6532.
- Kchour, G., Rezaee, R., Farid, R., Ghantous, A., Rafatpanah, H., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Berry, F., Mortada, M., et al. (2013). The combination of arsenic, interferon-alpha, and zidovudine restores an “immunocompetent-like” cytokine expression profile in patients with adult T-cell leukemia lymphoma. *Retrovirology* *10*, 91.
- Kehn, K., Fuente, C. de la, Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., Mahieux, R., Pumfery, A., Bottazzi, M.E., and Kashanchi, F. (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* *24*, 525–540.
- Kendall, E.A., González, E., Espinoza, I., Tipismana, M., Verdonck, K., Clark, D., Vermund, S.H., and Gotuzzo, E. (2009). Early neurologic abnormalities associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in a cohort of Peruvian children. *J. Pediatr.* *155*, 700–706.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 159–180.

- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 661, 3–38.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Hermine, O., de Thé, H., and Bazarbachi, A. (2005). Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-kappaB pathway. *Cell Death Differ. 12 Suppl 1*, 871–877.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Favre-Bonvin, A., El-Sabban, M., Renault, N., Giron, M.L., Setterblad, N., El Hajj, H., Chiari, E., Mikati, A.G., et al. (2008). Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27, 1665–1676.
- Kfoury, Y., Setterblad, N., El-Sabban, M., Zamborlini, A., Dassouki, Z., El Hajj, H., Hermine, O., Pique, C., de The, H., Saib, A., et al. (2011). Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 117, 190–199.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Journo, C., Mahieux, R., Pique, C., and Bazarbachi, A. (2012). The Multifaceted Oncoprotein Tax. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 85–120.
- Kibler, K.V., and Jeang, K.T. (2001). CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 75, 2161–2173.
- Kim, Y.-M., Geiger, T.R., Egan, D.I., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 29, 2142–2152.
- Kimzey, A.L., and Dynan, W.S. (1998). Specific regions of contact between human T-cell leukemia virus type I Tax protein and DNA identified by photocross-linking. *J. Biol. Chem.* 273, 13768–13775.
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2010). Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *J. Virol.* 84, 5431–5437.
- Kinpara, S., Ito, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., et al. (2014). Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NFκB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia*.
- Kira, J., Fujihara, K., Itoyama, Y., Goto, I., and Hasuo, K. (1991). Leukoencephalopathy in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: MRI analysis and a two year follow-up study after corticosteroid therapy. *J. Neurol. Sci.* 106, 41–49.
- Koga, H., Ohshima, T., and Shimotohno, K. (2004). Enhanced activation of tax-dependent transcription of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) long terminal repeat by TORC3. *J. Biol. Chem.* 279, 52978–52983.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 937–953.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563.

Komurian, F., Pelloquin, F., and de Thé, G. (1991). In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J. Virol.* 65, 3770–3778.

Koralnik, I.J., Boeri, E., Saxinger, W.C., Monico, A.L., Fullen, J., Gessain, A., Guo, H.G., Gallo, R.C., Markham, P., and Kalyanaraman, V. (1994). Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 68, 2693–2707.

Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25–33.

Kraus, Z.J., Nakano, H., and Bishop, G.A. (2009). TRAF5 is a critical mediator of in vitro signals and in vivo functions of LMP1, the viral oncogenic mimic of CD40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17140–17145.

Krueger, A., Fas, S.C., Giaisi, M., Bleumink, M., Merling, A., Stumpf, C., Baumann, S., Holtkotte, D., Bosch, V., Krammer, P.H., et al. (2006). HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* 107, 3933–3939.

Kuroda, Y., and Matsui, M. (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 42, 223–226.

L

La Grenade, L. (1996). HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 13 Suppl 1, S46–S49.

Lairmore, M., and Franchini, G. (2007). Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. *Fields Virol.* 2, 2071–2106.

Lairmore, M.D., Haines, R., and Anupam, R. (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr. Opin. Virol.* 2, 474–481.

Lal, R.B., Owen, S.M., Rudolph, D.L., Dawson, C., and Prince, H. (1995). In vivo cellular tropism of human T-lymphotropic virus type II is not restricted to CD8+ cells. *Virology* 210, 441–447.

Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F.W., Perret, G., Jones, K.S., et al. (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113, 5176–5185.

Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H., and Darnay, B.G. (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282, 4102–4112.

- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R.B., and Bex, F. (2005). Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF- κ B activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10391–10406.
- Lanoix, J., Lacoste, J., Pepin, N., Rice, N., and Hiscott, J. (1994). Overproduction of NF κ B2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated trans-activation via the NF- κ B signalling pathway. *Oncogene* *9*, 841–852.
- Laperche, S., Worms, B., Pillonel, J., European Network of Transfusion Medicine Societies, and Steering Committee (2009). Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sang.* *96*, 104–110.
- Laperche, S., Lefrère, J.-J., Morel, P., Pouchol, E., and Pozzetto, B. (2015). [Blood transfusion: control of infectious risks]. *Presse Médicale Paris Fr.* *144*, 189–199.
- Larocca, D., Chao, L.A., Seto, M.H., and Brunck, T.K. (1989). Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *163*, 1006–1013.
- Lavorgna, A., and Harhaj, E. (2014). Regulation of HTLV-1 Tax Stability, Cellular Trafficking and NF- κ B Activation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Viruses* *6*, 3925–3943.
- Lavorgna, A., and Harhaj, E.W. (2012). An RNA interference screen identifies the Deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF- κ B activation. *J. Virol.* *86*, 3357–3369.
- Laydon, D.J., Melamed, A., Sim, A., Gillet, N.A., Sim, K., Darko, S., Kroll, J.S., Douek, D.C., Price, D.A., Bangham, C.R.M., et al. (2014). Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity. *PLoS Comput. Biol.* *10*, e1003646.
- Le Blanc, I., Grange, M.P., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Blot, V., Pique, C., and Dokh lar, M.C. (2001). HTLV-1 structural proteins. *Virus Res.* *78*, 5–16.
- Le Blanc, I., Pr vost, M.-C., Dokh lar, M.-C., and Rosenberg, A.R. (2002). The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process. *J. Virol.* *76*, 10024–10029.
- Leclercq, I., Cavrois, M., Mortreux, F., Hermine, O., Gessain, A., Morschhauser, F., and Wattel, E. (1998). Oligoclonal proliferation of human T-cell leukaemia virus type 1 bearing T cells in adult T-cell leukaemia/lymphoma without deletion of the 3' provirus integration sites. *Br. J. Haematol.* *101*, 500–506.
- Lee, M.-H., and Miyamoto, S. (2011). Expanding NF κ B and SUMO ties. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3983–3984.
- Lee, R., and Schwartz, R.A. (2011). Human T-lymphotropic virus type 1-associated infective dermatitis: a comprehensive review. *J. Am. Acad. Dermatol.* *64*, 152–160.
- Lehky, T.J., Fox, C.H., Koenig, S., Levin, M.C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C.S., Osame, M., and Jacobson, S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann. Neurol.* *37*, 167–175.

- Lemasson, I., Lewis, M.R., Polakowski, N., Hivin, P., Cavanagh, M.-H., Thébault, S., Barbeau, B., Nyborg, J.K., and Mesnard, J.-M. (2007). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) bZIP Protein Interacts with the Cellular Transcription Factor CREB To Inhibit HTLV-1 Transcription. *J. Virol.* *81*, 1543–1553.
- Lemoine, F.J., and Marriott, S.J. (2001). Accelerated G(1) phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* *276*, 31851–31857.
- Lemoine, F.J., and Marriott, S.J. (2002). Genomic instability driven by the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) oncoprotein, Tax. *Oncogene* *21*, 7230–7234.
- Lemoine, F.J., Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (2000). Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *16*, 1623–1627.
- Leung, K., and Nabel, G.J. (1988). HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF-kappa B-like factor. *Nature* *333*, 776–778.
- Levin, M.C., Lee, S.M., Morcos, Y., Brady, J., and Stuart, J. (2002). Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. *J. Infect. Dis.* *186*, 1514–1517.
- Lezin, A., Gillet, N., Olindo, S., Signaté, A., Grandvaux, N., Verlaeten, O., Belrose, G., de Carvalho Bittencourt, M., Hiscott, J., Asquith, B., et al. (2007). Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* *110*, 3722–3728.
- Li, H.-C., Biggar, R.J., Miley, W.J., Maloney, E.M., Cranston, B., Hanchard, B., and Hisada, M. (2004). Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* *190*, 1275–1278.
- Li, M., Kesic, M., Yin, H., Yu, L., and Green, P.L. (2009). Kinetic Analysis of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gene Expression in Cell Culture and Infected Animals. *J. Virol.* *83*, 3788–3797.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* *279*, 26243–26250.
- Liégeois, F., Lafay, B., Switzer, W.M., Locatelli, S., Mpoudi-Ngolé, E., Loul, S., Heneine, W., Delaporte, E., and Peeters, M. (2008). Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. *Virology* *371*, 405–417.
- Liu, H.F., Vandamme, A.M., Van Brussel, M., Desmyter, J., and Goubau, P. (1994). New retroviruses in human and simian T-lymphotropic viruses. *Lancet* *344*, 265–266.
- Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Masuda, S., Tokioka, T., Yamaoka, S., Maruyama, I., and Kitajima, I. (2001). Phosphoinositide-3 kinase-PKB/Akt pathway activation is involved in fibroblast Rat-1 transformation by human T-cell leukemia virus type I tax. *Oncogene* *20*, 2514–2526.

- Lobjois, V. (2005). [Cycling without D-type cyclin]. *Médecine Sci. MS* 21, 19–22.
- Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer* 7, 861–869.
- Lodewick, J., Lamsoul, I., Polania, A., Lebrun, S., Burny, A., Ratner, L., and Bex, F. (2009). Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* 386, 68–78.
- Lodewick, J., Lamsoul, I., and Bex, F. (2011). Move or die: the fate of the Tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* 3, 829–857.
- Low, K.G., Dorner, L.F., Fernando, D.B., Grossman, J., Jeang, K.T., and Comb, M.J. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax releases cell cycle arrest induced by p16INK4a. *J. Virol.* 71, 1956–1962.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Fletcher, T.M., Schiltz, R.L., Nagaich, A.K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P.A., and Brady, J.N. (2002). Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4450–4462.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Linton, R., Park, H.U., Schiltz, R.L., Sartorelli, V., and Brady, J.N. (2004). Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* 78, 6735–6743.
- Lundblad, J.R., Kwok, R.P., Laurance, M.E., Huang, M.S., Richards, J.P., Brennan, R.G., and Goodman, R.H. (1998). The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.* 273, 19251–19259.
- Lyra-da-Silva, J.O., de Mello Gonzaga, Y.B., de Melo Espíndola, O., de Andrada-Serpa, M.J., Dib, C., and Jeunon, T. (2012). Adult T-cell leukemia/lymphoma: a case report of primary cutaneous tumoral type. *Dermatol. Pract. Concept.* 2, 202a03.

M

- Macatonia, S.E., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Knight, S.C. (1992). Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1699–1706.
- Mahieux, R. (2011). [Virological aspects of HTLV-1 infection and new therapeutical concepts]. *Bull. Société Pathol. Exot.* 1990 104, 181–187.
- Mahieux, R., and Gessain, A. (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. *Viruses* 3, 1074–1090.
- Mahieux, R., Ibrahim, F., Mauclere, P., Herve, V., Michel, P., Tekaiia, F., Chappey, C., Garin, B., Van Der Ryst, E., Guillemain, B., et al. (1997). Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J. Virol.* 71, 1317–1333.

- Mahieux, R., Pise-Masison, C.A., Lambert, P.F., Nicot, C., De Marchis, L., Gessain, A., Green, P., Hall, W., and Brady, J.N. (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*, 6866–6874.
- Majone, F., and Jeang, K.T. (2000). Clastogenic effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein correlates with unstabilized DNA breaks. *J. Biol. Chem.* *275*, 32906–32910.
- Majone, F., Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1993). Induction of micronuclei by HTLV-I Tax: a cellular assay for function. *Virology* *193*, 456–459.
- Majone, F., Luisetto, R., Zamboni, D., Iwanaga, Y., and Jeang, K.-T. (2005). Ku protein as a potential human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax target in clastogenic chromosomal instability of mammalian cells. *Retrovirology* *2*, 45.
- Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Fuller, S.D., and Bangham, C.R.M. (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* *3*, e2251.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* *115*, 449–459.
- Mann, M.C., Strobel, S., Fleckenstein, B., and Kress, A.K. (2014). The transcription elongation factor ELL2 is specifically upregulated in HTLV-1-infected T-cells and is dependent on the viral oncoprotein Tax. *Virology* *464-465*, 98–110.
- Mansky, L.M., and Gajary, L.C. (2002). The primary nucleotide sequence of the bovine leukemia virus RNA packaging signal can influence efficient RNA packaging and virus replication. *Virology* *301*, 272–280.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* *TIG 27*, 295–306.
- Marçais, A., Suarez, F., Sibon, D., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2012). Clinical Trials of Adult T-Cell Leukaemia/Lymphoma Treatment. *Leuk. Res. Treat.* *2012*.
- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S.C., Tatham, M.H., Hay, R.T., Lamond, A.I., Mann, M., and Vertegaal, A.C. (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol. Cell. Proteomics* *7*, 132–144.
- Matsuoka, M. (2005). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology* *2*, 27.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 270–280.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* *30*, 1379–1389.
- Matsuura, E., Yamano, Y., and Jacobson, S. (2010). Neuroimmunity of HTLV-I Infection. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *5*, 310–325.

- Mazurov, D., Heidecker, G., and Derse, D. (2006). HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* 346, 194–204.
- McCool, K.W., and Miyamoto, S. (2012). DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol. Rev.* 246, 311–326.
- McGill, N.-K., Vyas, J., Shimauchi, T., Tokura, Y., and Piguet, V. (2012). HTLV-1-associated infective dermatitis: updates on the pathogenesis. *Exp. Dermatol.* 21, 815–821.
- Meertens, L., Rigoulet, J., Mauclère, P., Van Beveren, M., Chen, G.M., Diop, O., Dubreuil, G., Georges-Goubot, M.C., Berthier, J.L., Lewis, J., et al. (2001). Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: close relationship of STLV-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. *Virology* 287, 275–285.
- Meertens, L., Mahieux, R., Mauclère, P., Lewis, J., and Gessain, A. (2002). Complete Sequence of a Novel Highly Divergent Simian T-Cell Lymphotropic Virus from Wild-Caught Red-Capped Mangabeys (*Cercocebus torquatus*) from Cameroon: a New Primate T-Lymphotropic Virus Type 3 Subtype. *J. Virol.* 76, 259–268.
- Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A., and Mahieux, R. (2004). A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* 279, 43307–43320.
- Melamed, A., Laydon, D.J., Gillet, N.A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2013). Genome-wide Determinants of Proviral Targeting, Clonal Abundance and Expression in Natural HTLV-1 Infection. *PLoS Pathog.* 9.
- Mendes, G.B., Kalil, R.S., Rosadas, C., de Freitas, M.R.G., and Puccioni-Sohler, M. (2014). Temporal lesions and widespread involvement of white matter associated with multi-organ inflammatory disease in human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 25, 1–3.
- Mercurio, F., DiDonato, J.A., Rosette, C., and Karin, M. (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev.* 7, 705–718.
- Merle, H., Cabre, P., Olindo, S., Merle, S., and Smadja, D. (2002). Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). *Am. J. Ophthalmol.* 134, 190–195.
- Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 531–537.
- Michael, B., Nair, A.M., Datta, A., Hiraragi, H., Ratner, L., and Lairmore, M.D. (2006). Histone acetyltransferase (HAT) activity of p300 modulates human T lymphotropic virus type 1 p30II-mediated repression of LTR transcriptional activity. *Virology* 354, 225–239.
- Miller, F., Afonso, P.V., Gessain, A., and Ceccaldi, P.-E. (2012). Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence* 3, 222–229.

- Miller, J.M., Miller, L.D., Olson, C., and Gillette, K.G. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *43*, 1297–1305.
- Minowada, J., Ohnuma, T., and Moore, G.E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* *49*, 891–895.
- Miura, T., Fukunaga, T., Igarashi, T., Yamashita, M., Ido, E., Funahashi, S., Ishida, T., Washio, K., Ueda, S., and Hashimoto, K. (1994). Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 1124–1127.
- Miyake, H., Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1999). Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* *253*, 155–161.
- Miyamoto, K., Tomita, N., Ishii, A., Nishizaki, T., Kitajima, K., Tanaka, T., Nakamura, T., Watanabe, S., and Oda, T. (1984). Transformation of ATLA-negative leukocytes by blood components from anti-ATLA-positive donors in vitro. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *33*, 721–725.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K., and Hinuma, Y. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* *294*, 770–771.
- Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujishita, M., Taguchi, H., Kubonishi, I., Niiya, K., and Minezawa, M. (1982). Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet* *2*, 658.
- Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Tajima, K., Yoshimura, K., Nakashima, S., Shirao, M., Araki, S., Miyata, N., and Mori, S. (1992). Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J. Infect. Dis.* *166*, 943–944.
- Moens, B., López, G., Aduai, V., González, E., Kerremans, L., Clark, D., Verdonck, K., Gotuzzo, E., Vanham, G., Cassar, O., et al. (2009). Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 3682–3691.
- Morales-Sánchez, A., and Fuentes-Pananá, E.M. (2014). Human viruses and cancer. *Viruses* *6*, 4047–4079.
- Morcock, D.R., Kane, B.P., and Casas-Finet, J.R. (2000). Fluorescence and nucleic acid binding properties of the human T-cell leukemia virus-type 1 nucleocapsid protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1481*, 381–394.
- Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2001). Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes* *22*, 279–287.

Mori, N., Yamada, Y., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Tsukasaki, K., Tanaka, Y., Tomonaga, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2002). Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 100, 1828–1834.

Morimoto, H., Tsukada, J., Kominato, Y., and Tanaka, Y. (2005). Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia. *Am. J. Hematol.* 78, 100–107.

Morrison, D.K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011254.

Mühleisen, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2014). Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell Death Dis.* 5, e1575.

Mulloy, J.C., Migone, T.S., Ross, T.M., Ton, N., Green, P.L., Leonard, W.J., and Franchini, G. (1998a). Human and simian T-cell leukemia viruses type 2 (HTLV-2 and STLV-2(pan-p)) transform T cells independently of Jak/STAT activation. *J. Virol.* 72, 4408–4412.

Mulloy, J.C., Kislyakova, T., Cereseto, A., Casareto, L., LoMonico, A., Fullen, J., Lorenzi, M.V., Cara, A., Nicot, C., Giam, C., et al. (1998b). Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J. Virol.* 72, 8852–8860.

Murphy, E.L., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Holding-Cobham, M., Cranston, B., Malley, K., Bodner, A.J., Alexander, S.S., and Blattner, W.A. (1991). Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am. J. Epidemiol.* 133, 1114–1124.

Murphy, E.L., Friley, J., Smith, J.W., Engstrom, J., Sacher, R.A., Miller, K., Gible, J., Stevens, J., Thomson, R., Hansma, D., et al. (1997). HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology* 48, 315–320.

N

Nagai, M., and Osame, M. (2003). Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J. Neurovirol.* 9, 228–235.

Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C.R., Izumo, S., et al. (1998). Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J. Neurovirol.* 4, 586–593.

Nagai, M., Brennan, M.B., Sakai, J.A., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* 98, 1858–1861.

Nakada, K., Yamaguchi, K., Furugen, S., Nakasone, T., Nakasone, K., Oshiro, Y., Kohakura, M., Hinuma, Y., Seiki, M., and Yoshida, M. (1987). Monoclonal integration of HTLV-I proviral DNA in patients with strongyloidiasis. *Int. J. Cancer* 40, 145–148.

- Nakagawa, M., Nakahara, K., Maruyama, Y., Kawabata, M., Higuchi, I., Kubota, H., Izumo, S., Arimura, K., and Osame, M. (1996). Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* 2, 345–355.
- Nakamura, S., Nagano, I., Yoshioka, M., Shimazaki, S., Onodera, J., and Kogure, K. (1993). Detection of tumor necrosis factor- α -positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 42, 127–130.
- Nakano, D., Ishitsuka, K., Ikeda, M., Tsuchihashi, R., Okawa, M., Okabe, H., Tamura, K., and Kinjo, J. (2015). Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (IV): phenanthroindolizidine alkaloids from *Tylophora tanakae* leaves. *J. Nat. Med.*
- Nakao, K., Ohba, N., Nakagawa, M., and Osame, M. (1999). Clinical course of HTLV-I-associated uveitis. *Jpn. J. Ophthalmol.* 43, 404–409.
- Nasr, R. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* 107, 4021–4029.
- Nasr, R., El Hajj, H., Kfoury, Y., de Thé, H., Hermine, O., and Bazarbachi, A. (2011). Controversies in targeted therapy of adult T cell leukemia/lymphoma: ON target or OFF target effects? *Viruses* 3, 750–769.
- Nejmeddine, M., Barnard, A.L., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (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, V.S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2009). HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114, 1016–1025.
- Nerenberg, M., Hinrichs, S.H., Reynolds, R.K., Khoury, G., and Jay, G. (1987). The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 237, 1324–1329.
- Neuveut, C., Low, K.G., Maldarelli, F., Schmitt, I., Majone, F., Grassmann, R., and Jeang, K.T. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3620–3632.
- Ni, C.-Y., Wu, Z.-H., Florence, W.C., Parekh, V.V., Arrate, M.P., Pierce, S., Schweitzer, B., Van Kaer, L., Joyce, S., Miyamoto, S., et al. (2008). Cutting edge: K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 7107–7111.
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14, 381–395.
- Nicot, C., Dundr, M., Johnson, J.M., Fullen, J.R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G.L., Derse, D., Misteli, T., and Franchini, G. (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat. Med.* 10, 197–201.

Nyunoya, H., Akagi, T., Ogura, T., Maeda, S., and Shimotohno, K. (1988). Evidence for phosphorylation of trans-activator p40x of human T-cell leukemia virus type I produced in insect cells with a baculovirus expression vector. *Virology* 167, 538–544.

O

Oh, U., Yamano, Y., Mora, C.A., Ohayon, J., Bagnato, F., Butman, J.A., Dambrosia, J., Leist, T.P., McFarland, H., and Jacobson, S. (2005). Interferon-beta1a therapy in human T-lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *Ann. Neurol.* 57, 526–534.

Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S., Ishida, T., Yamaguchi, K., Horie, R., Watanabe, T., and Umezawa, K. (2007). Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Lett.* 257, 206–215.

Okamura, J., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Uike, N., Sonoda, S., Kannagi, M., Tomonaga, M., Harada, M., Kimura, N., Masuda, M., et al. (2005). Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 105, 4143–4145.

Olière, S., Hernandez, E., Lézin, A., Arguello, M., Douville, R., Nguyen, T.L.-A., Olindo, S., Panelatti, G., Kazanji, M., Wilkinson, P., et al. (2010). HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathog.* 6, e1001177.

Olière, S., Douville, R., Sze, A., Belgnaoui, S.M., and Hiscott, J. (2011). Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 197–210.

Olindo, S., Lézin, A., Cabre, P., Merle, H., Saint-Vil, M., Edimonana Kaptue, M., Signate, A., Césaire, R., and Smadja, D. (2005). HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J. Neurol. Sci.* 237, 53–59.

Olindo, S., Cabre, P., Lézin, A., Merle, H., Saint-Vil, M., Signate, A., Bonnan, M., Chalon, A., Magnani, L., Cesaire, R., et al. (2006). Natural history of human T-lymphotropic virus 1-associated myelopathy: a 14-year follow-up study. *Arch. Neurol.* 63, 1560–1566.

Oliveira, M. de F.S.P. de, Brites, C., Ferraz, N., Magalhaes, P., Almeida, F., and Bittencourt, A.L. (2005). Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 40, e90–e96.

Ono, A., Ikeda, E., Mochizuki, M., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Sawada, T., Yamane, S., Tokudome, S., and Watanabe, T. (1998). Provirus load in patients with human T-cell leukemia virus type 1 uveitis correlates with precedent Graves' disease and disease activities. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 89, 608–614.

Orland, J.R., Engstrom, J., Fridey, J., Sacher, R.A., Smith, J.W., Nass, C., Garratty, G., Newman, B., Smith, D., Wang, B., et al. (2003). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* 61, 1588–1594.

Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* *1*, 1031–1032.

Oteiza, A., and Mehti, N. (2011). The human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein tax controls forkhead box O4 activity through degradation by the proteasome. *J. Virol.* *85*, 6480–6491.

P

Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* *16*, 83–89.

Paiva, A., and Casseb, J. (2014). Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *47*, 265–274.

Park, H.U., Jeong, J.-H., Chung, J.H., and Brady, J.N. (2004). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. *Oncogene* *23*, 4966–4974.

Park, H.U., Jeong, S.-J., Jeong, J.-H., Chung, J.H., and Brady, J.N. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax attenuates gamma-irradiation-induced apoptosis through physical interaction with Chk2. *Oncogene* *25*, 438–447.

Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* *118*, 3030–3044.

Paun, L., Ispas, O., Del Mistro, A., and Chieco-Bianchi, L. (1994). HTLV-I in Romania. *Eur. J. Haematol.* *52*, 117–118.

Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2006). Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* *281*, 8927–8938.

Peloponese, J.-M., Iha, H., Yedavalli, V.R.K., Miyazato, A., Li, Y., Haller, K., Benkirane, M., and Jeang, K.-T. (2004). Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J. Virol.* *78*, 11686–11695.

Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., and Jeang, K.-T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18974–18979.

Peloponese, J.-M., Yasunaga, J., Kinjo, T., Watashi, K., and Jeang, K.-T. (2009). Peptidylproline cis-trans-isomerase Pin1 interacts with human T-cell leukemia virus type 1 tax and modulates its activation of NF-kappaB. *J. Virol.* *83*, 3238–3248.

Pène, S., Waast, L., Bonnet, A., Bénil, L., and Pique, C. (2014). A non-SUMOylated tax protein is still functional for NF-κB pathway activation. *J. Virol.* *88*, 10655–10661.

- Pépin, J., Labbé, A.-C., Mamadou-Yaya, F., Mbélesso, P., Mbadingäi, S., Deslandes, S., Locas, M.-C., and Frost, E. (2010). Iatrogenic transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 and hepatitis C virus through parenteral treatment and chemoprophylaxis of sleeping sickness in colonial Equatorial Africa. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *51*, 777–784.
- Pépin, N., Roulston, A., Lacoste, J., Lin, R., and Hiscott, J. (1994). Subcellular redistribution of HTLV-1 Tax protein by NF-kappa B/Rel transcription factors. *Virology* *204*, 706–716.
- Philpott, S.M., and Buehring, G.C. (1999). Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 933–942.
- Piguet, V., and Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. *J. Clin. Invest.* *114*, 605–610.
- Pinheiro, S.R.A.A., Martins-Filho, O.A., Ribas, J.G.R., Catalan-Soares, B.C., Proietti, F.A., Namen-Lopes, S., Brito-Melo, G.E.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., and GIPH (Interdisciplinary HTLV-I/II Research Group) (2006). Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Am. J. Ophthalmol.* *142*, 811–815.
- Piñon, J.D., Klasse, P.J., Jassal, S.R., Welson, S., Weber, J., Brighty, D.W., and Sattentau, Q.J. (2003). Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* *77*, 9922–9930.
- Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* *3*.
- Pique, C., Pham, D., Tursz, T., and Dokhélar, M.C. (1992). Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *J. Virol.* *66*, 906–913.
- Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Sakaguchi, K., Appella, E., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *J. Virol.* *72*, 6348–6355.
- Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Mahieux, R., Chatterjee, P., Whiteford, C., Duvall, J., Guillermin, C., Gessain, A., and Brady, J.N. (2002). Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res.* *62*, 3562–3571.
- Plancoulaine, S., Buigues, R.P., Murphy, E.L., van Beveren, M., Pouliquen, J.F., Joubert, M., Rémy, F., Tuppin, P., Tortevoeye, P., de Thé, G., et al. (1998). Demographic and familial characteristics of HTLV-1 infection among an isolated, highly endemic population of African origin in French Guiana. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *76*, 331–336.
- Plechanovová, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2012). Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* *489*, 115–120.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7415–7419.

Popovic, M., Sarin, P.S., Robert-Gurroff, M., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Minowada, J., and Gallo, R.C. (1983). Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). *Science* 219, 856–859.

Pringle, C.R. (1998). Virus taxonomy—San Diego 1998. *Arch. Virol.* 143, 1449–1459.

Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Soares, B.C., and Murphy, E.L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058–6068.

Pujari, R., Hunte, R., Thomas, R., van der Weyden, L., Rauch, D., Ratner, L., Nyborg, J.K., Ramos, J.C., Takai, Y., and Shembade, N. (2015). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax requires CADM1/TSLC1 for inactivation of the NF- κ B inhibitor A20 and constitutive NF- κ B signaling. *PLoS Pathog.* 11, e1004721.

Pumfery, A., de la Fuente, C., and Kashanchi, F. (2006). HTLV-1 Tax: centrosome amplification and cancer. *Retrovirology* 3, 50.

Q

Qayyum, S., and Choi, J.K. (2014). Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 282–286.

Qu, Z., and Xiao, G. (2011). Human T-Cell Lymphotropic Virus: A Model of NF- κ B-Associated Tumorigenesis. *Viruses* 3, 714–749.

Qu, Z., Qing, G., Rabson, A., and Xiao, G. (2004). Tax deregulation of NF-kappaB2 p100 processing involves both beta-TrCP-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 279, 44563–44572.

R

Rayne, F., Kajava, A.V., Lalanne, J., and Mamoun, R.Z. (2004). In vivo homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA gives clues to the retroviral capsid and TM envelope protein arrangement. *J. Mol. Biol.* 343, 903–916.

Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E., and Sun, S.-C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3886–3895.

Rende, F., Cavallari, I., Romanelli, M.G., Diani, E., Bertazzoni, U., and Ciminale, V. (2012). Comparison of the Genetic Organization, Expression Strategies and Oncogenic Potential of HTLV-1 and HTLV-2. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–14.

Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 363–397.

Rice, N.R., MacKichan, M.L., and Israël, A. (1992). The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. *Cell* 71, 243–253.

Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Dalgleish, A.G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* 64, 5682–5687.

- Robek, M.D., and Ratner, L. (1999). Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* *73*, 4856–4865.
- Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., et al. (2011). Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses* *3*, 1210–1248.
- Román, G.C., and Osame, M. (1988). Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet* *1*, 651.
- Romanelli, M.G., Diani, E., Bergamo, E., Casoli, C., Ciminale, V., Bex, F., and Bertazzoni, U. (2013). Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Front. Microbiol.* *4*.
- Romero, I.A., Prevost, M.C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P.O., and Ozden, S. (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. *J. Virol.* *74*, 6021–6030.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., Willems, L., Kettmann, R., Campbell, K., Zaya, R., Burny, A., and Haseltine, W.A. (1986). The 3' region of bovine leukemia virus genome encodes a trans-activator protein. *EMBO J.* *5*, 2585–2589.
- Rosenberg, A.R., Delamarre, L., Pique, C., Le Blanc, I., Griffith, G., and Dokh elar, M.C. (1999). Early assembly step of a retroviral envelope glycoprotein: analysis using a dominant negative assay. *J. Cell Biol.* *145*, 57–68.
- Roti, G., and Stegmaier, K. (2014). New Approaches to Target T-ALL. *Front. Oncol.* *4*, 170.
- Roucoux, D.F., and Murphy, E.L. (2004). The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev.* *6*, 144–154.
- Roucoux, D.F., Wang, B., Smith, D., Nass, C.C., Smith, J., Hutching, S.T., Newman, B., Lee, T.-H., Chafets, D.M., Murphy, E.L., et al. (2005). A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J. Infect. Dis.* *191*, 1490–1497.
- Rouet, F., Rabier, R., Foucher, C., Chancerel, B., Agis, F., and Strobel, M. (1999). Geographical clustering of human T-cell lymphotropic virus type I in Guadeloupe, an endemic Caribbean area. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *81*, 330–334.
- Rous, P. (1911). A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J. Exp. Med.* *13*, 397–411.
- Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996). Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* *381*, 328–331.
- Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1998). The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* *16*, 643–654.

Ruben, S., Poteat, H., Tan, T.H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W., and Rosen, C.A. (1988). Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 241, 89–92.

Ruggero, K., Corradin, A., Zanovello, P., Amadori, A., Bronte, V., Ciminale, V., and D'Agostino, D.M. (2010). Role of microRNAs in HTLV-1 infection and transformation. *Mol. Aspects Med.* 31, 367–382.

Ruggero, K., Guffanti, A., Corradin, A., Sharma, V.K., De Bellis, G., Corti, G., Grassi, A., Zanovello, P., Bronte, V., Ciminale, V., et al. (2014). Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase. *J. Virol.* 88, 3612–3622.

Russell, W.C., Newman, C., and Williamson, D.H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253, 461–462.

Ryan, O., Smyth, M.R., and Fágáin, C.O. (1994). Horseradish peroxidase: the analyst's friend. *Essays Biochem.* 28, 129–146.

S

Sagar, D., Masih, S., Schell, T., Jacobson, S., Comber, J.D., Philip, R., Wigdahl, B., Jain, P., and Khan, Z.K. (2014). In vivo immunogenicity of Tax(11-19) epitope in HLA-A2/DTR transgenic mice: implication for dendritic cell-based anti-HTLV-1 vaccine. *Vaccine* 32, 3274–3284.

Saggiaro, D., Barp, S., and Chieco-Bianchi, L. (2001). Block of a mitochondrial-mediated apoptotic pathway in Tax-expressing murine fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 269, 245–255.

Saito, M. (2010). Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010, 478461.

Saito, K., Saito, M., Taniura, N., Okuwa, T., and Ohara, Y. (2010). Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology* 403, 173–180.

Saksena, N.K., Sherman, M.P., Yanagihara, R., Dube, D.K., and Poiesz, B.J. (1992). LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. *Virology* 189, 1–9.

Salemi, M., Van Dooren, S., Audenaert, E., Delaporte, E., Goubau, P., Desmyter, J., and Vandamme, A.M. (1998). Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. *Virology* 246, 277–287.

Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T. (2006). Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Leukemia* 20, 590–598.

- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N., and Kashanchi, F. (1999). Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* *73*, 9917–9927.
- Sarangi, P., and Zhao, X. (2015). SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 233–242.
- Sarge, K.D., and Park-Sarge, O.-K. (2009). Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 200–205.
- Satou, Y., and Matsuoka, M. (2013). Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1: Mechanism of HTLV-1 associated diseases. *Rev. Med. Virol.* *23*, 269–280.
- Satou, Y., Nosaka, K., Koya, Y., Yasunaga, J.-I., Toyokuni, S., and Matsuoka, M. (2004). Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* *18*, 1357–1363.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 720–725.
- Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P.L., Ohkura, N., et al. (2011). HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* *7*, e1001274.
- Satou, Y., Utsunomiya, A., Tanabe, J., Nakagawa, M., Nosaka, K., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* *9*, 46.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., and Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Res.* *4*, 234–238.
- Sebban-Benin, H., Pescatore, A., Fusco, F., Pascuale, V., Gautheron, J., Yamaoka, S., Moncla, A., Ursini, M.V., and Courtois, G. (2007). Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2805–2815.
- Seiki, M., Hattori, S., and Yoshida, M. (1982). Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 6899–6902.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3618–3622.
- Seiki, M., Eddy, R., Shows, T.B., and Yoshida, M. (1984). Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature* *309*, 640–642.

Seiki, M., Inoue, J., Hidaka, M., and Yoshida, M. (1988). Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 7124–7128.

Semmes, O.J. (2006). Adult T cell leukemia: a tale of two T cells. *J. Clin. Invest.* *116*, 858–860.

Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1992a). HTLV-I Tax is a zinc-binding protein: role of zinc in Tax structure and function. *Virology* *188*, 754–764.

Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1992b). Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *J. Virol.* *66*, 7183–7192.

Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1995). Definition of a minimal activation domain in human T-cell leukemia virus type I Tax. *J. Virol.* *69*, 1827–1833.

Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1996). Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J. Virol.* *70*, 6347–6357.

Sever, R., and Brugge, J.S. (2015). *Signal Transduction in Cancer*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *5*.

Shembade, N., and Harhaj, E.W. (2010). Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF- κ B activation. *World J. Biol. Chem.* *1*, 13–20.

Shembade, N., Harhaj, N.S., Yamamoto, M., Akira, S., and Harhaj, E.W. (2007). The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein Requires the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ubc13 for NF- κ B Activation. *J. Virol.* *81*, 13735–13742.

Shembade, N., Harhaj, N.S., Parvatiyar, K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Matesic, L.E., and Harhaj, E.W. (2008). The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat. Immunol.* *9*, 254–262.

Shembade, N., Parvatiyar, K., Harhaj, N.S., and Harhaj, E.W. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF- κ B signalling. *EMBO J.* *28*, 513–522.

Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E.W. (2010). Inhibition of NF- κ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* *327*, 1135–1139.

Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N.S., Abbott, D.W., and Harhaj, E.W. (2011). The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat. Immunol.* *12*, 834–843.

Shibata, Y., Tanaka, Y., Gohda, J., and Inoue, J. -i. (2011). Activation of the I κ B kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J. Biochem. (Tokyo)* *150*, 679–686.

Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* *79*, 428–437.

- Shirinian, M., Kfoury, Y., Dassouki, Z., El-Hajj, H., and Bazarbachi, A. (2013). Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front. Microbiol.* *4*.
- Shoji, T., Higuchi, M., Kondo, R., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Aoyagi, Y., and Fujii, M. (2009). Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology* *6*, 83.
- Sibon, D., Gabet, A.-S., Zandecki, M., Pinatel, C., Thête, J., Delfau-Larue, M.-H., Rabaaoui, S., Gessain, A., Gout, O., Jacobson, S., et al. (2006). HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. *J. Clin. Invest.* *116*, 974–983.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001). NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* *15*, 2321–2342.
- Sinha-Datta, U., Datta, A., Ghorbel, S., Dodon, M.D., and Nicot, C. (2007). Human T-cell lymphotropic virus type I rex and p30 interactions govern the switch between virus latency and replication. *J. Biol. Chem.* *282*, 14608–14615.
- Sintasath, D.M., Wolfe, N.D., Lebreton, M., Jia, H., Garcia, A.D., Le Doux-Diffo, J., Tamoufe, U., Carr, J.K., Folks, T.M., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2009). Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* *15*, 175–184.
- Siu, Y.-T., Chin, K.-T., Siu, K.-L., Yee Wai Choy, E., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J. Virol.* *80*, 7052–7059.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009). The Role of Ubiquitin in NF- κ B Regulatory Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 769–796.
- Skloot, R. (2010). “The Immortal Life of Henrietta Lacks.” *N. Y. Times*.
- Slattery, J.P., Franchini, G., and Gessain, A. (1999). Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* *9*, 525–540.
- Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 449–479.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1990). Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev.* *4*, 1875–1885.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1992). Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* *187*, 316–320.
- Stewart, D.M., Ramanathan, R., Mahanty, S., Fedorko, D.P., Janik, J.E., and Morris, J.C. (2011). Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Haematol.* *126*, 63–67.

- Suarez, F., Marcais, A., Ghez, D., Delarue, R., Deau-Fischer, B., Aoun, C., Fontbrune, F.S. de, Ysebaert, L., Asnafi, V., Canioni, D., et al. (2011). Arsenic trioxide in the treatment of HTLV1 associated ATLL. *Retrovirology* 8, A59.
- Sullivan, M.T., Williams, A.E., Fang, C.T., Grandinetti, T., Poiesz, B.J., and Ehrlich, G.D. (1991). Transmission of human T-lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. A retrospective study of recipients of blood components (1983 through 1988). The American Red Cross HTLV-I/II Collaborative Study Group. *Arch. Intern. Med.* 151, 2043–2048.
- Sun, S.-C., and Ley, S.C. (2008). New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* 29, 469–478.
- Sun, S.-C., and Yamaoka, S. (2005). Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* 24, 5952–5964.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.-K., Xia, Z.-P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell* 14, 289–301.
- Sun, S.C., Harhaj, E.W., Xiao, G., and Good, L. (2000). Activation of I-kappaB kinase by the HTLV type 1 Tax protein: mechanistic insights into the adaptor function of IKKgamm. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1591–1596.
- Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* 9, 3099–3105.
- Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T., and Yoshida, M. (1995). Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* 10, 1199–1207.
- Suzuki, T., Kitao, S., Matsushime, H., and Yoshida, M. (1996). HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J.* 15, 1607–1614.
- Suzuki, T., Narita, T., Uchida-Toita, M., and Yoshida, M. (1999). Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms. *Virology* 259, 384–391.
- Switzer, W.M., Salemi, M., Qari, S.H., Jia, H., Gray, R.R., Katzourakis, A., Marriott, S.J., Pryor, K.N., Wolfe, N.D., Burke, D.S., et al. (2009). Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. *Retrovirology* 6, 9.
- Szymocha, R., Brisson, C., Bernard, A., Akaoka, H., Belin, M.F., and Giraudon, P. (2000a). Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J. Neurovirol.* 6, 350–357.
- Szymocha, R., Akaoka, H., Brisson, C., Beurton-Marduel, P., Chalon, A., Bernard, A., Didier-Bazes, M., Belin, M.F., and Giraudon, P. (2000b). Astrocytic alterations induced by HTLV type 1-infected T lymphocytes: a role for Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1723–1729.

T

Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., et al. (2001). Critical Roles of TRAF2 and TRAF5 in Tumor Necrosis Factor-induced NF- κ B Activation and Protection from Cell Death. *J. Biol. Chem.* 276, 36530–36534.

Takahashi, T., Takase, H., Urano, T., Sugita, S., Miyata, K., Miyata, N., and Mochizuki, M. (2000). Clinical features of human T-lymphotropic virus type 1 uveitis: a long-term follow-up. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 8, 235–241.

Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 109, 559–567.

Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1071–1075.

Tanaka, G., Okayama, A., Watanabe, T., Aizawa, S., Stuver, S., Mueller, N., Hsieh, C.-C., and Tsubouchi, H. (2005). The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J. Infect. Dis.* 191, 1140–1147.

Tanaka, Y., Fukudome, K., Hayashi, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1995). Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cell-leukemia cell lines. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 60, 554–561.

Tang, E.D., and Wang, C.-Y. (2010). TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling. *PloS One* 5, e9172.

Taylor, G.P., Goon, P., Furukawa, Y., Green, H., Barfield, A., Mosley, A., Nose, H., Babiker, A., Rudge, P., Usuku, K., et al. (2006). Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology* 3, 63.

Taylor, J.M., Brown, M., Nejmeddine, M., Kim, K.J., Ratner, L., Lairmore, M., and Nicot, C. (2009). Novel role for interleukin-2 receptor-Jak signaling in retrovirus transmission. *J. Virol.* 83, 11467–11476.

Terme, J.-M., Mocquet, V., Kuhlmann, A.-S., Zane, L., Mortreux, F., Wattel, E., Duc Dodon, M., and Jalinot, P. (2009). Inhibition of the hTERT promoter by the proto-oncogenic protein TAL1. *Leukemia* 23, 2081–2089.

Thénoz, M., Vernin, C., Mortada, H., Karam, M., Pinatel, C., Gessain, A., Webb, T.R., Auboeuf, D., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology* 11, 119.

Thorstensson, R., Albert, J., and Andersson, S. (2002). Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion (Paris)* 42, 780–791.

- Tie, F., Adya, N., Greene, W.C., and Giam, C.Z. (1996). Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. *J. Virol.* *70*, 8368–8374.
- Tokunaga, F. (2013). Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* *154*, 313–323.
- Tokura, Y., Sawada, Y., and Shimauchi, T. (2014). Skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma: clinical, cytological and immunological features. *J. Dermatol.* *41*, 19–25.
- Tomoiu, A., Gravel, A., Tanguay, R.M., and Flamand, L. (2006). Functional interaction between human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and ubiquitin-conjugating enzyme 9 in the absence of sumoylation. *J. Virol.* *80*, 10218–10228.
- Tooley, J.G., and Schaner Tooley, C.E. (2014). New roles for old modifications: emerging roles of N-terminal post-translational modifications in development and disease. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *23*, 1641–1649.
- Toro, C., Benito, R., Aguilera, A., Bassani, S., Rodríguez, C., Calderón, E., Caballero, E., Alvarez, P., García, J., Rodríguez-Iglesias, M., et al. (2005). Infection with human T lymphotropic virus type I in organ transplant donors and recipients in Spain. *J. Med. Virol.* *76*, 268–270.
- Toulza, F., Nosaka, K., Tanaka, Y., Schioppa, T., Balkwill, F., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2010). Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 183–189.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 4350–4354.
- Trempe, J.-F. (2011). Reading the ubiquitin postal code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 792–801.
- Treuter, E., and Venteclef, N. (2011). Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 909–918.
- Tsuji, T., Sheehy, N., Gautier, V.W., Hayakawa, H., Sawa, H., and Hall, W.W. (2007). The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is carrier- and energy-independent. *J. Biol. Chem.* *282*, 13875–13883.
- Tsukasaki, K., and Tobinai, K. (2014). Human T-cell Lymphotropic Virus Type I–Associated Adult T-cell Leukemia–Lymphoma: New Directions in Clinical Research. *Clin. Cancer Res.* *20*, 5217–5225.
- Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J.C., Harrington, W., O’Mahony, D., Janik, J.E., Bittencourt, A.L., Taylor, G.P., et al. (2009). Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 453–459.
- Turci, M., Lodewick, J., Righi, P., Polania, A., Romanelli, M.G., Bex, F., and Bertazzoni, U. (2009). HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax. *Virology* *386*, 6–11.

Turci, M., Lodewick, J., Di Gennaro, G., Rinaldi, A.S., Marin, O., Diani, E., Sampaio, C., Bex, F., Bertazzoni, U., Romanelli, M.G., et al. (2012). Ubiquitination and sumoylation of the HTLV-2 Tax-2B protein regulate its NF- κ B activity: a comparative study with the HTLV-1 Tax-1 protein. *Retrovirology* 9, 102.

Turpin, J., Journo, C., Ko, N.L., Sinet, F., Carpentier, A., Galioot, A., Edwards, D., Vandamme, A.-M., Gazzolo, L., Duc Dodon, M., et al. (2015). Discovery and characterization of auxiliary proteins encoded by type 3 simian T-cell lymphotropic viruses. *J. Virol.* 89, 931–951.

U

Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481–492.

Ueda, K., Kusuhara, K., Tokugawa, K., Miyazaki, C., Yoshida, C., Tokumura, K., Sonoda, S., and Takahashi, K. (1989). Cohort effect on HTLV-I seroprevalence in southern Japan. *Lancet* 2, 979.

Ueki, K., Fruman, D.A., Brachmann, S.M., Tseng, Y.-H., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2002). Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell. Biol.* 22, 965–977.

Uhlik, M., Good, L., Xiao, G., Harhaj, E.W., Zandi, E., Karin, M., and Sun, S.C. (1998). NF- κ B-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T-cell leukemia virus I Tax-mediated NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 273, 21132–21136.

Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A.T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 424–430.

Ureta-Vidal, A., Angelin-Duclos, C., Tortevoeye, P., Murphy, E., Lepère, J.F., Buigues, R.P., Jolly, N., Joubert, M., Carles, G., Pouliquen, J.F., et al. (1999). Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 82, 832–836.

V

Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733.

Van Brussel, M., Salemi, M., Liu, H.F., Gabriëls, J., Goubau, P., Desmyter, J., and Vandamme, A.M. (1998). The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from *Pan paniscus* is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization. *Virology* 243, 366–379.

Vandamme, A.M., Van Laethem, K., Liu, H.F., Van Brussel, M., Delaporte, E., de Castro Costa, C.M., Fleischer, C., Taylor, G., Bertazzoni, U., Desmyter, J., et al. (1997). Use of a generic polymerase chain reaction assay detecting human T-lymphotropic virus (HTLV) types I, II and divergent simian strains in the evaluation of individuals with indeterminate HTLV serology. *J. Med. Virol.* 52, 1–7.

- Vandamme, A.M., Salemi, M., and Desmyter, J. (1998). The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol.* *6*, 477–483.
- Vandamme, A.M., Bertazzoni, U., and Salemi, M. (2000). Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. *Gene* *261*, 171–180.
- Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 323–357.
- Van Dooren, S., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2001). Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes. *Mol. Biol. Evol.* *18*, 661–671.
- Van Dooren, S., Meertens, L., Lemey, P., Gessain, A., and Vandamme, A.-M. (2005). Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in *Macaca arctoides*. *J. Gen. Virol.* *86*, 1953–1959.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (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.
- Van Wijk, S.J.L., and Timmers, H.T.M. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* *24*, 981–993.
- Varadaraj, A., Mattoscio, D., and Chiocca, S. (2014). SUMO Ubc9 enzyme as a viral target: SUMO Ubc9 Enzyme as a Viral Target. *IUBMB Life* *66*, 27–33.
- Vatsyayan, J., Qing, G., Xiao, G., and Hu, J. (2008). SUMO1 modification of NF- κ B2/p100 is essential for stimuli-induced p100 phosphorylation and processing. *EMBO Rep.* *9*, 885–890.
- Veelken, H., Köhler, G., Schneider, J., Dierbach, H., Mertelsmann, R., Schaefer, H.E., and Lübbert, M. (1996). HTLV-I-associated adult T cell leukemia/lymphoma in two patients from Bucharest, Romania. *Leukemia* *10*, 1366–1369.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., and Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect. Dis.* *7*, 266–281.
- Verdonck, K., González, E., Maldonado, F., Agapito, D., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Silva-Santisteban, A., Vanham, G., Clark, D., and Gotuzzo, E. (2009). Comparison of three ELISAs for the routine diagnosis of human T-lymphotropic virus infection in a high-prevalence setting in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *103*, 420–422.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* *36*, 131–149.
- Vernin, C., Thenoz, M., Pinatel, C., Gessain, A., Gout, O., Delfau-Larue, M.-H., Nazaret, N., Legras-Lachuer, C., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res.* *74*, 6082–6093.
- Vertegaal, A.C.O. (2011). Uncovering ubiquitin and ubiquitin-like signaling networks. *Chem. Rev.* *111*, 7923–7940.

Vet, J.A., Majithia, A.R., Marras, S.A., Tyagi, S., Dube, S., Poiesz, B.J., and Kramer, F.R. (1999). Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 6394–6399.

Vitte, A.-L., Buchsbaum, S., and Jalinot, P. (2006). Modulation of HIV-1 Rev protein abundance and activity by polyubiquitination with unconventional Lys-33 branching. *FEBS Lett.* *580*, 6155–6160.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* *408*, 307–310.

W

Wagner, S., and Green, M.R. (1993). HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science* *262*, 395–399.

Wäldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B.R., and Grassmann, R. (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* *107*, 4491–4499.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346–351.

Wang, H., Machesky, N.J., and Mansky, L.M. (2004). Both the PPPY and PTAP Motifs Are Involved in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Release. *J. Virol.* *78*, 1503–1512.

Wang, T.G., Ye, J., Lairmore, M.D., and Green, P.L. (2000). In vitro cellular tropism of human T cell leukemia virus type 2. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *16*, 1661–1668.

Wang, W., Zhou, J., Shi, J., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2014). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax-deregulated autophagy pathway and c-FLIP expression contribute to resistance against death receptor-mediated apoptosis. *J. Virol.* *88*, 2786–2798.

Wang, X., Herr, R.A., and Hansen, T.H. (2012). Ubiquitination of substrates by esterification. *Traffic Cph. Den.* *13*, 19–24.

Wasik, U., and Filipek, A. (2014). Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 2878–2885.

Watanabe, T., Seiki, M., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1986). Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* *148*, 385–388.

Wattel, E., Vartanian, J.P., Pannetier, C., and Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* *69*, 2863–2868.

Wattel, E., Cavrois, M., Gessain, A., and Wain-Hobson, S. (1996). Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *13 Suppl 1*, S92–S99.

Wencker, M., Sausse, C., Derse, D., Gazzolo, L., and Duc Dodon, M. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein down-regulates pre-T-cell receptor alpha gene transcription in human immature thymocytes. *J. Virol.* *81*, 301–308.

Whang-Peng, J., Bunn, P.A., Knutsen, T., Kao-Shan, C.S., Broder, S., Jaffe, E.S., Gelmann, E., Blattner, W., Lofters, W., and Young, R.C. (1985). Cytogenetic studies in human T-cell lymphoma virus (HTLV)-positive leukemia-lymphoma in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* *74*, 357–369.

Wiktor, S.Z., Pate, E.J., Rosenberg, P.S., Barnett, M., Palmer, P., Medeiros, D., Maloney, E.M., and Blattner, W.A. (1997). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J. Hum. Virol.* *1*, 37–44.

Wilkinson, K.A., and Henley, J.M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* *428*, 133–145.

Winter, H.Y., and Marriott, S.J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J. Virol.* *81*, 6089–6098.

Wolfe, N.D., Heneine, W., Carr, J.K., Garcia, A.D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J.N., Prosser, A.T., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7994–7999.

Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Vologodskaja, M., Steinman, R.M., and Choi, Y. (1998). The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 28355–28359.

Wu, X., and Sun, S.-C. (2007). Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF- κ B by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep.* *8*, 510–515.

Wu, C.-J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2006). NEMO is a sensor of Lys 63-linked polyubiquitination and functions in NF- κ B activation. *Nat. Cell Biol.* *8*, 398–406.

Wu, K., Bottazzi, M.E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S.D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A., et al. (2004). Protein profile of tax-associated complexes. *J. Biol. Chem.* *279*, 495–508.

Wu, X., Zhang, M., and Sun, S.-C. (2011). Mutual regulation between deubiquitinase CYLD and retroviral oncoprotein Tax. *Cell Biosci.* *1*, 27.

X

Xiao, G., and Fu, J. (2011). NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 192–221.

Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2000). Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK) regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J. Biol. Chem.* *275*, 34060–34067.

Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol. Cell* *7*, 401–409.

Xiao, G., Rabson, A.B., Young, W., Qing, G., and Qu, Z. (2006). Alternative pathways of NF- κ B activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 281–293.

- Xie, P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J. Mol. Signal.* 8, 7.
- Xie, L., and Green, P.L. (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. Virol.* 79, 14536–14545.
- Xie, J., Ge, S., Zhang, Y., Lin, Y., Ni, H., Zhang, J., and Chen, C. (2015). The Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus Infection among Blood Donors in Southeast China, 2004-2013. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003685.
- Xu, L.-G., Li, L.-Y., and Shu, H.-B. (2004). TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 17278–17282.
- Xu, X., Heidenreich, O., Kitajima, I., McGuire, K., Li, Q., Su, B., and Nerenberg, M. (1996). Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* 13, 135–142.
- γ
- Yamagishi, M., and Watanabe, T. (2012). [miRNA in HTLV-1 related disease]. *Uirusu* 62, 9–18.
- Yamaguchi, K. (1994). Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet* 343, 213–216.
- Yamaguchi, K., and Watanabe, T. (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int. J. Hematol.* 76 Suppl 2, 240–245.
- Yamamoto, B., Li, M., Kesic, M., Younis, I., Lairmore, M.D., and Green, P.L. (2008). Human T-cell leukemia virus type 2 post-transcriptional control protein p28 is required for viral infectivity and persistence in vivo. *Retrovirology* 5, 38.
- Yamamoto, K., Ishida, T., Nakano, K., Yamagishi, M., Yamochi, T., Tanaka, Y., Furukawa, Y., Nakamura, Y., and Watanabe, T. (2011). SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci.* 102, 260–266.
- Yamamoto, N., Okada, M., Koyanagi, Y., Kannagi, M., and Hinuma, Y. (1982). Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science* 217, 737–739.
- Yamano, Y., Cohen, C.J., Takenouchi, N., Yao, K., Tomaru, U., Li, H.-C., Reiter, Y., and Jacobson, S. (2004). Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J. Exp. Med.* 199, 1367–1377.
- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., and Hatanaka, M. (1996). Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J.* 15, 873–887.
- Yan, P., Fu, J., Qu, Z., Li, S., Tanaka, T., Grusby, M.J., and Xiao, G. (2009a). PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* 113, 4370–4380.

- Yan, P., Qu, Z., Ishikawa, C., Mori, N., and Xiao, G. (2009b). Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia N. Y. N* 11, 1036–1041.
- Yanagihara, R. (1994). Geographic-specific genotypes or topotypes of human T-cell lymphotropic virus type I as markers for early and recent migrations of human populations. *Adv. Virus Res.* 43, 147–186.
- Yang, L., Kotomura, N., Ho, Y.-K., Zhi, H., Bixler, S., Schell, M.J., and Giam, C.-Z. (2011). Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J. Virol.* 85, 3001–3009.
- Yano, H., Ishida, T., Inagaki, A., Ishii, T., Kusumoto, S., Komatsu, H., Iida, S., Utsunomiya, A., and Ueda, R. (2007). Regulatory T-cell function of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 2052–2057.
- Yasunaga, J., and Matsuoka, M. (2011). Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int. J. Hematol.* 94, 435–442.
- Yasunaga, J., Lin, F.C., Lu, X., and Jeang, K.-T. (2011). Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF-kappaB signaling. *J. Virol.* 85, 6212–6219.
- Yasunaga Ji, null, Sakai, T., Nosaka, K., Etoh Ki, null, Tamiya, S., Koga, S., Mita, S., Uchino, M., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. (2001). Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood* 97, 3177–3183.
- Ye, J., Xie, L., and Green, P.L. (2003). Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. *J. Virol.* 77, 7728–7735.
- Yeung, M.L., Yasunaga, J., Bennasser, Y., Duseti, N., Harris, D., Ahmad, N., Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2008). Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 68, 8976–8985.
- Yin, M.J., Paulssen, E.J., Seeler, J.S., and Gaynor, R.B. (1995). Protein domains involved in both in vivo and in vitro interactions between human T-cell leukemia virus type I tax and CREB. *J. Virol.* 69, 3420–3432.
- Yin, M.J., Christerson, L.B., Yamamoto, Y., Kwak, Y.T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M.H., and Gaynor, R.B. (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 93, 875–884.
- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. *J. Virol.* 82, 9359–9368.
- Yoshita, M., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., and Fujii, M. (2012). Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* 103, 369–374.

Younis, I., and Green, P.L. (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10, 431–445.

Younis, I., Khair, L., Dundr, M., Lairmore, M.D., Franchini, G., and Green, P.L. (2004). Repression of human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 replication by a viral mRNA-encoded posttranscriptional regulator. *J. Virol.* 78, 11077–11083.

Yu, F., Itoyama, Y., Fujihara, K., and Goto, I. (1991). Natural killer (NK) cells in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-decrease in NK cell subset populations and activity in HTLV-I seropositive individuals. *J. Neuroimmunol.* 33, 121–128.

Yu, Q., Minoda, Y., Yoshida, R., Yoshida, H., Iha, H., Kobayashi, T., Yoshimura, A., and Takaesu, G. (2008). HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 189–194.

Z

Zane, L., and Jeang, K.-T. (2012). The importance of ubiquitination and sumoylation on the transforming activity of HTLV Tax-1 and Tax-2. *Retrovirology* 9, 103.

Zane, L., Sibon, D., Mortreux, F., and Wattel, E. (2009). Clonal expansion of HTLV-1 infected cells depends on the CD4 versus CD8 phenotype. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3935–3941.

Zane, L., Sibon, D., Legras, C., Lachuer, J., Wierinckx, A., Mehlen, P., Delfau-Larue, M.-H., Gessain, A., Gout, O., Pinatel, C., et al. (2010). Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8+ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* 407, 341–351.

Zane, L., Yasunaga, J., Mitagami, Y., Yedavalli, V., Tang, S.-W., Chen, C.-Y., Ratner, L., Lu, X., and Jeang, K.-T. (2012a). Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. *Retrovirology* 9, 114.

Zane, L., Sibon, D., Capraro, V., Galia, P., Karam, M., Delfau-Larue, M.-H., Gilson, E., Gessain, A., Gout, O., Hermine, O., et al. (2012b). HTLV-1 positive and negative T cells cloned from infected individuals display telomerase and telomere genes deregulation that predominate in activated but untransformed CD4+ T cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 131, 821–833.

Zhang, J., Yamada, O., Kawagishi, K., Araki, H., Yamaoka, S., Hattori, T., and 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.

Zhang, W., Nisbet, J.W., Albrecht, B., Ding, W., Kashanchi, F., Bartoe, J.T., and Lairmore, M.D. (2001). Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J. Virol.* 75, 9885–9895.

Zhao, L.J., and Giam, C.Z. (1992). Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7070–7074.

Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* 113, 2755–2764.

Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood* *118*, 1865–1876.

Zheng, H., Wolfe, N.D., Sintasath, D.M., Tamoufe, U., Lebreton, M., Djoko, C.F., Dikko, J.L.D., Pike, B.L., Heneine, W., and Switzer, W.M. (2010). Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology* *401*, 137–145.

Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* *9*, 625–636.

Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R., and Brady, J.N. (2006). Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J. Virol.* *80*, 4781–4791.

Zotti, T., Vito, P., and Stilo, R. (2012). The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J. Cell. Physiol.* *227*, 1280–1284.

Annexes

➤ **ANNEXE 1:**

A non-SUMOylated tax protein is still functional for NF- κ B pathway activation

Pène, S., Waast, L., Bonnet, A., Bénit, L., and Pique, C. *J Virol.* 2014 Sep ; 88 (18) :10655-61.

➤ **ANNEXE 2:**

Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter
activation

Bonnet, A., Randrianarison-Huetz, V., Nzounza, P., Nedelec, M., Chazal, M., Waast, L., Pene, S., Bazarbachi, A., Mahieux, R., Bénit, L., and Pique, C. *Retrovirology.* 2012 Sep 25 ; 9:77.

ANNEXE 1:

A non-SUMOylated tax protein is still functional for NF- κ B pathway activation

Sabrina Pène, Laetitia Waast, Amandine Bonnet, Laurence Bénit and Claudine Pique

J Virol. 2014 Sep ; 88 (18) : 10655-61

**A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still
Functional for NF- κ B Pathway Activation**

Sabrina Pène, Laetitia Waast, Amandine Bonnet, Laurence
Bénit and Claudine Pique

J. Virol. 2014, 88(18):10655. DOI: 10.1128/JVI.01827-14.
Published Ahead of Print 2 July 2014.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/88/18/10655>

	<i>These include:</i>
REFERENCES	This article cites 22 articles, 10 of which can be accessed free at: http://jvi.asm.org/content/88/18/10655#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF- κ B Pathway Activation

Sabrina Pène, Laetitia Waast, Amandine Bonnet, Laurence Bénit, Claudine Pique

INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France, CNRS, UMR8104, Paris, France, and Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ABSTRACT

Whether NF- κ B promoter transactivation by the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax protein requires Tax SUMOylation is still a matter of debate. In this study, we revisited the role of Tax SUMOylation using a strategy based on the targeting of Ubc9, the unique E2 SUMO-conjugating enzyme. We show that either a catalytically inactive form of Ubc9 (Ubc9-C93S) or Ubc9 small interfering RNA (siRNA) dramatically reduces Tax conjugation to endogenous SUMO-1 or SUMO-2/3, demonstrating that as expected, Tax SUMOylation is under the control of the catalytic activity of Ubc9. We further report that a non-SUMOylated Tax protein produced in 293T cells is still able to activate either a transfected or an integrated NF- κ B reporter promoter and to induce expression of an NF- κ B-regulated endogenous gene. Importantly, blocking Ubc9 activity in T cells also results in the production of a non-SUMOylated Tax that is still fully functional for the activation of a NF- κ B promoter. These results provide the definitive evidence that Tax SUMOylation is not required for NF- κ B-driven gene induction.

IMPORTANCE

Human T-cell leukemia virus type 1 is able to transform CD4⁺ T lymphocytes. The viral oncoprotein Tax plays a key role in this process by promoting cell proliferation and survival, mainly through permanent activation of the NF- κ B pathway. Elucidating the molecular mechanisms involved in NF- κ B pathway activation by Tax is therefore a key issue to understand HTLV-1-mediated transformation. Tax SUMOylation was initially proposed to be critical for Tax-induced NF- κ B promoter activation, which was challenged by our later observation that a low-level-SUMOylated Tax mutant was still functional for activation of NF- κ B promoters. To clarify the role of Tax SUMOylation, we set up a new approach based on the inhibition of the SUMOylation machinery in Tax-expressing cells. We show that blocking the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 abolishes Tax SUMOylation and that a non-SUMOylated Tax still activates NF- κ B promoters in either adherent cells or T cells.

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), a highly aggressive malignant proliferation of CD4⁺ T lymphocytes. About 5% of HTLV-1-infected individuals develop ATLL, and this cancer occurs after a prolonged latency period (1). The oncogenic capacity of HTLV-1 is mainly due to the regulatory Tax protein, which promotes permanent T-cell proliferation through various mechanisms (2). In particular, Tax promotes permanent activation of the NF- κ B pathway (3), inducing thereby the expression of a large series of proteins governing cell growth and survival (4). Importantly, Tax-induced NF- κ B activation was shown to be critical for HTLV-1-induced immortalization of primary CD4⁺ T lymphocytes (5).

In previous studies, we and others demonstrated that Tax is conjugated to ubiquitin (Ub), notably to K63-linked Ub chains, and to either SUMO-1 or SUMO-2/3 molecules (6–12). In an initial study based on the analysis of a set of ubiquitin- and SUMO-deficient lysine Tax mutants fused or not to either Ub or SUMO, we concluded that the two modifications were each required for NF- κ B activation. Indeed, we proposed that Tax ubiquitination is required for the activation of the cytoplasmic I κ B kinase (IKK) complex and that Tax SUMOylation facilitates promoter activation in the nucleus (7). However, our subsequent finding that a Tax mutant that was properly ubiquitinated but poorly SUMOylated was still transcriptionally active supported the opposite view that Tax SUMOylation could be dispensable for NF- κ B promoter activation (12). In contrast with this conclusion, other groups then argued that even a low level of Tax SUMOyla-

tion might be critical for NF- κ B promoter activation by Tax (13–15), by acting through a threshold effect (14), as reported in other models (16).

To further explore the importance of Tax SUMOylation to NF- κ B activation, we designed a new strategy to generate a totally non-SUMOylated Tax without introducing mutations in Tax. We took advantage of the fact that SUMOylation relies on a unique E2-conjugating enzyme, namely, Ubc9 (16, 17), allowing easy inhibition of the SUMOylation process. We found that blocking either the activity or the expression of endogenous Ubc9 allows the production of a non-SUMOylated Tax and that this non-SUMOylated Tax is still able to activate NF- κ B promoters in both adherent cells and T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfection. 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, France) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and antibiotics (Life Technologies, France). The 293T cell lines containing an integrated NF- κ B reporter construct were generated following transfection of the pGL4.32

Received 23 June 2014 Accepted 26 June 2014

Published ahead of print 2 July 2014

Editor: S. R. Ross

Address correspondence to Claudine Pique, claudine.pique@inserm.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01827-14

plasmid (see below) and hygromycin selection. These cells were cultured in the same medium as 293T cells with addition of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of hygromycin. 293T cells were transfected using either the calcium phosphate procedure (luciferase assays) or the Lipofectamine reagent (nickel pull-down experiments) according to the manufacturer's procedure. The HTLV-1-negative MOLT4 T cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, France) supplemented as described above along with 0.5% glucose. MOLT4 T cells were transfected using the DMRIE-C reagent (Life Technologies, France) according to the manufacturer's procedure.

Plasmids and siRNA. The Tax, Tax-6His, and Tax-M22 constructs cloned into the pSG5m empty vector and the HA-SUMO-3 and HA-Ub constructs have been described previously (7). The His-SUMO-3 plasmid was kindly provided by V. Lallemand-Breitenbach (INSERM UMR 944, Paris, France). The T7-Ubc9-C93S, which encodes a T7-tagged version of an Ubc9 mutant in which a cysteine residue of the active site was changed to a serine (17), was kindly provided by S. Nisole (INSERM UMR-S 747, Paris, France). The pGL4.32 plasmid, which contains the Luc2P gene under the control of five κB response elements and a hygromycin resistance gene, and the pRL-TK normalization plasmid, which encodes the *Renilla* luciferase under the control of the constitutive thymidine kinase promoter, were obtained from Promega (France). Control (siRNA-A, sc-37007) and Ubc9 (sc-36773) small interfering RNAs (siRNAs) were from Santa Cruz (Heidelberg, Germany).

Antibodies. The following primary antibodies were used: anti-SUMO-1 (no. 4930S) and anti-Ub-K63 (no. 5621S) (Cell Signaling, Ozyme, France), anti-SUMO-2/3 (ab3742; Abcam, France), anti-Ubc9 (sc-10759; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), and antihemagglutinin (anti-HA) (12CA5; Roche, France). Tax was detected with a serum obtained from an HTLV-1-infected individual. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human, anti-mouse, and anti-rabbit IgGs (Promega, France) were used as secondary antibodies in Western blotting.

Nickel pull-down experiments. 293T cells (3.5×10^6 cells seeded the day before in a 100-mm dish) and MOLT4 T cells (1.5×10^6 cells/well in a 6-well culture plate) were transfected with 3 μg of Tax-6His construct and either the control or Ubc9-C93S construct (3 μg) or the control or Ubc9 siRNA (50 nM). At 48 h or 72 h posttransfection, cells were lysed under reducing and highly stringent conditions in buffer A (6 M guanidium HCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 10 mM imidazole, pH 8) and incubated with 25 μl of Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid (NTA) beads (Sigma, France) for 3 h at room temperature. The beads were washed three times in buffer A, then twice in buffer B (buffer A diluted 1:4 in buffer C), and finally twice in buffer C (25 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10 mM imidazole). Bound proteins were eluted by adding 2 \times Laemmli buffer (Sigma, France), and purified proteins were analyzed by Western blotting as described below.

Western blotting. Cells were lysed on ice for 20 min in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8], 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, and 150 mM NaCl) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche, France), and lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 14,000 \times g. Total proteins or proteins purified by nickel pull-down were mixed with 2 \times Laemmli buffer (Sigma, France), subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were then blocked in 5% nonfat dry milk and incubated with primary and secondary antibodies. Chemiluminescence reagents (Thermo Scientific, France) were finally used for signal detection.

Luciferase-based reporter assays. 293T cells (3×10^4 cells/well seeded the day before in 24-well plates) and MOLT4 T cells (4×10^5 cells/well in 24-well plates) were transfected with 500 ng of Tax-6His and with either the control or Ubc9-C93S construct (500 ng) or the control or Ubc9 siRNA (50 nM). After a 48-hour period of culture, cells were subjected to a second round of transfection with 200 ng of the pGL4.32 plasmid and the pRL-TK normalization plasmid for 293T cells (5 ng) and MOLT4 (20 ng) and with only the pRL-TK plasmid (5 ng) for the pGL4.32

stable 293T cell lines. Luciferase activity was quantified at 24 h after the second transfection using the dual-luciferase reporter assay system (Promega, France), and values were normalized with *Renilla* activity.

RNA extraction and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Total RNAs were prepared with the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, France), and 1 μg of RNA was reverse transcribed using the Maxima first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, France), according to the manufacturer's procedure. Real-time PCR was performed in a Light-Cycler 2.0 (Roche, France) on 10 ng of reverse-transcribed RNA using the real-time-ready ICAM-1 primers (no. 04685105001; Roche, France) and primers for Tax (forward, 5'TTCCCAGGGTTTGACAGAG3'; reverse, 5'GATGGGGTCCCAGGTGATCT3') and for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) housekeeping gene (forward, 5'TGACAC TGGCAAACAATGCA3'; reverse, 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT 3') (used for normalization). ICAM-1 PCR was conducted using the TaqMan technology with the following conditions: a first step of denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation (95°C for 10 s), annealing (60°C for 30 s), and extension (72°C for 1 s) and a final extension at 72°C for 5 min. The Sybr green technology was employed for amplification of Tax and HPRT with the following conditions: a first step of denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 0 s), annealing (60°C for 10 s), and extension (72°C for 8 s) and a final melting curve (95°C for 0 s, then 65°C for 15 s, and finally 95°C for 60 s).

RESULTS

Blocking Ubc9 abolishes Tax SUMOylation. As a strategy to abolish Tax SUMOylation, we evaluated the effect of either blocking or silencing Ubc9, the unique SUMO E2-conjugating enzyme. To block the function of endogenous Ubc9, we used a construct producing a dominant negative mutant (T7-Ubc9-C93S) shown to be able to block endogenous SUMOylation (17). For Ubc9 silencing, Tax-6His was transfected together with anti-Ubc9 siRNA. 293T cells were transfected with the Tax-6His construct in the presence of the Ubc9 mutant or Ubc9 siRNA, and the level of endogenous Tax SUMOylation was analyzed by nickel pull-down performed under highly stringent conditions followed by Western blotting using anti-SUMO or, as control, antiubiquitin antibodies, as described previously (7). SUMO-1- or SUMO-2/3-conjugated Tax species were found in cells transfected with Tax-6His (Fig. 1A and B, lanes 3) but not in those transfected with the untagged Tax construct (Fig. 1A and B, lanes 2) or the control plasmid (lanes 1), validating the experiment. Expressing Tax-6His together with Ubc9-C93S lowered Tax conjugation to either SUMO-1 or SUMO-2/3 to background levels, while the amount of either unconjugated Tax or K63-linked ubiquitinated Tax was not affected (Fig. 1A, lane 4). Strong reduction of Ubc9 was observed in cells treated with the Ubc9 siRNA compared to control cells (Fig. 1B, lysates, lanes 4 and 5). This coincided with a massive reduction of Tax conjugation to either SUMO-1 or SUMO-2/3 with no effect on Tax K63 ubiquitination (Fig. 1B, lane 5). Parallel experiments showed a massive reduction of conjugation of total proteins to transfected His-SUMO-3 upon either expression of Ubc9-C93S or treatment with siUbc9 (Fig. 1C, lanes 3 and 5), confirming the blockage of the endogenous SUMOylation machinery.

These data show that Tax SUMOylation is under the control of Ubc9 and that blocking or silencing Ubc9 is a valuable strategy for generating an ubiquitinated but not SUMOylated Tax protein without mutating Tax.

A non-SUMOylated Tax is able to activate a transfected or integrated NF- κB reporter gene. Luciferase-based reporter as-

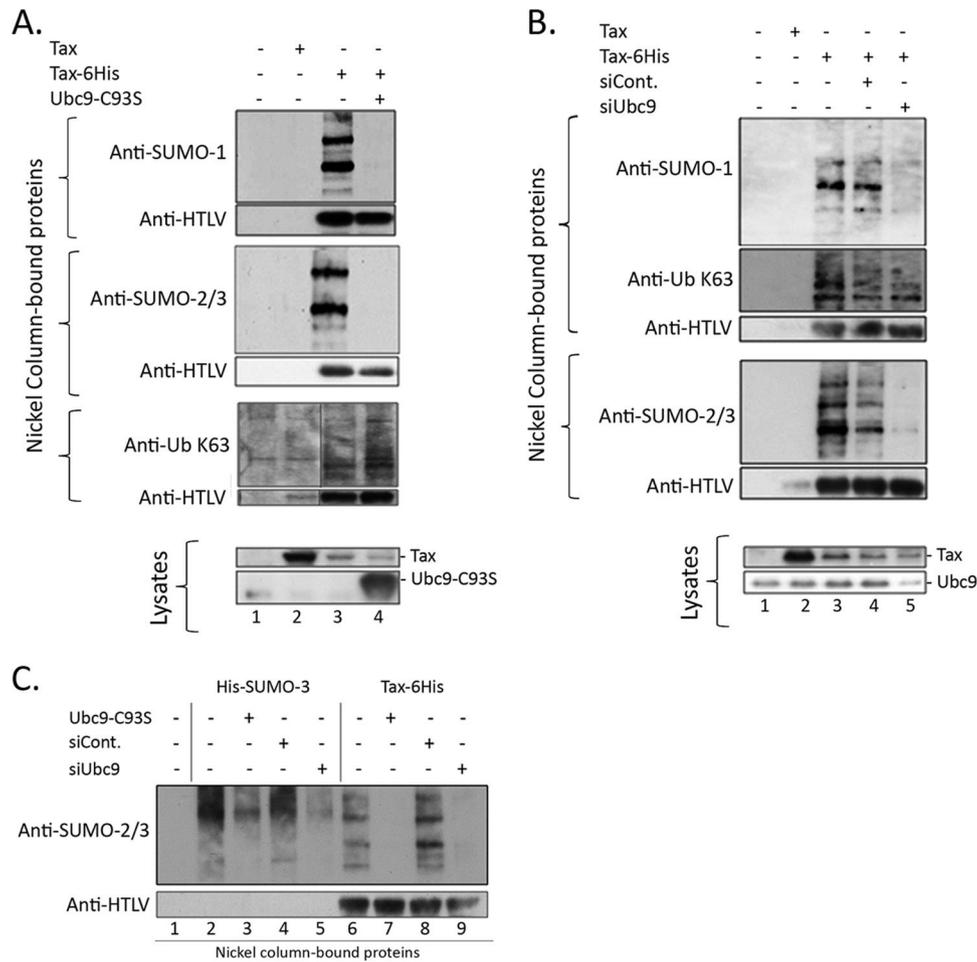


FIG 1 Endogenous Tax SUMOylation is dramatically reduced upon Ubc9 inhibition. Nickel pulldown and Western blot analyses were performed to study the effect of Ubc9 inhibition or silencing on endogenous Tax SUMOylation. (A) 293T cells were transfected with the Tax-6His construct and with the control or T7-Ubc9-C93S construct. Cells were lysed at 2 days posttransfection, and total proteins were either purified by nickel pulldown (nickel column-bound proteins) or directly analyzed by Western blotting to study Ubc9 and Tax expression (lysates). For nickel column-purified proteins, three separate gels were prepared that were blotted successively with the anti-SUMO-1 and HTLV-1 serum, the anti-SUMO-2/3 and HTLV-1 serum, or the anti-Ub-K63 and HTLV-1 serum. (B) 293T cells were transfected with the Tax-6His construct and with the control or Ubc9 siRNA, and total proteins were prepared as described above. For nickel column-purified proteins, two separate gels were prepared that were blotted successively with the anti-SUMO-1, anti-Ub-K63, and HTLV-1 serum or with the anti-SUMO-2/3 and HTLV-1 serum. (C) Nickel pulldown experiment to study the effect of Ubc9 inhibition or silencing on the SUMOylation of total proteins. 293T cells were transfected with either a His-SUMO-3 or the Tax-6His construct in the presence or absence of T7-Ubc9-C93S or siUbc9. Cells were lysed at 2 days posttransfection, and total proteins purified by nickel pulldown were analyzed by Western blotting using successively an anti-SUMO-2/3 antibody or the HTLV serum.

says to evaluate NF- κ B activation by non-SUMOylated Tax were performed in 293T cells. Cells were transfected with the Tax-6His construct and either the Ubc9-C93S construct or siUbc9 and cultivated for a 48-hour period, ensuring inhibition of Tax SUMOylation, as shown in Fig. 1. Cells were then subjected to a second round of transfection with the reporter plasmids, and luciferase activities were assessed after an additional 24-hour period. Similar levels of NF- κ B promoter activation were found in cells producing Tax-6His alone (set to 100%) or in combination with Ubc9-C93S (Fig. 2A, left side). Moreover, higher NF- κ B promoter activation was found in cells treated with the Ubc9 siRNA than in control cells (Fig. 2B, left side). To confirm these data, experiments were performed using two 293T cell lines in which the κ B reporter construct was integrated into chromatin (Fig. 2C and D). As above, Ubc9-C93S had no effect on Tax-induced NF- κ B promoter activation (Fig. 2C, left side) while higher activation was

observed with the Ubc9 siRNA (Fig. 2D, left side). Western blot analyses performed in parallel confirmed similar levels of Tax expression under all conditions as well as strong expression of Ubc9-C93S (Fig. 2A and C, right sides) and potent silencing of Ubc9 upon siRNA treatment (Fig. 2B and D, right sides).

A non-SUMOylated Tax is able to activate an NF- κ B-dependent endogenous gene. To study the impact of Tax SUMOylation on the activation of a natural NF- κ B-regulated promoter, we quantified by real-time PCR the expression of ICAM-1, which has been reported to be induced by Tax in an NF- κ B-dependent manner (18). 293T cells were first transfected with the Ubc9-C93S mutant (Fig. 3A) or the Ubc9 siRNA (Fig. 3B) and cultivated for 2 days to block the SUMOylation machinery prior to Tax expression. These cells then were transfected with the Tax-6His plasmid together with the control or Ubc9-C93S construct or with the control or Ubc9 siRNA for an additional 24-hour period. As a

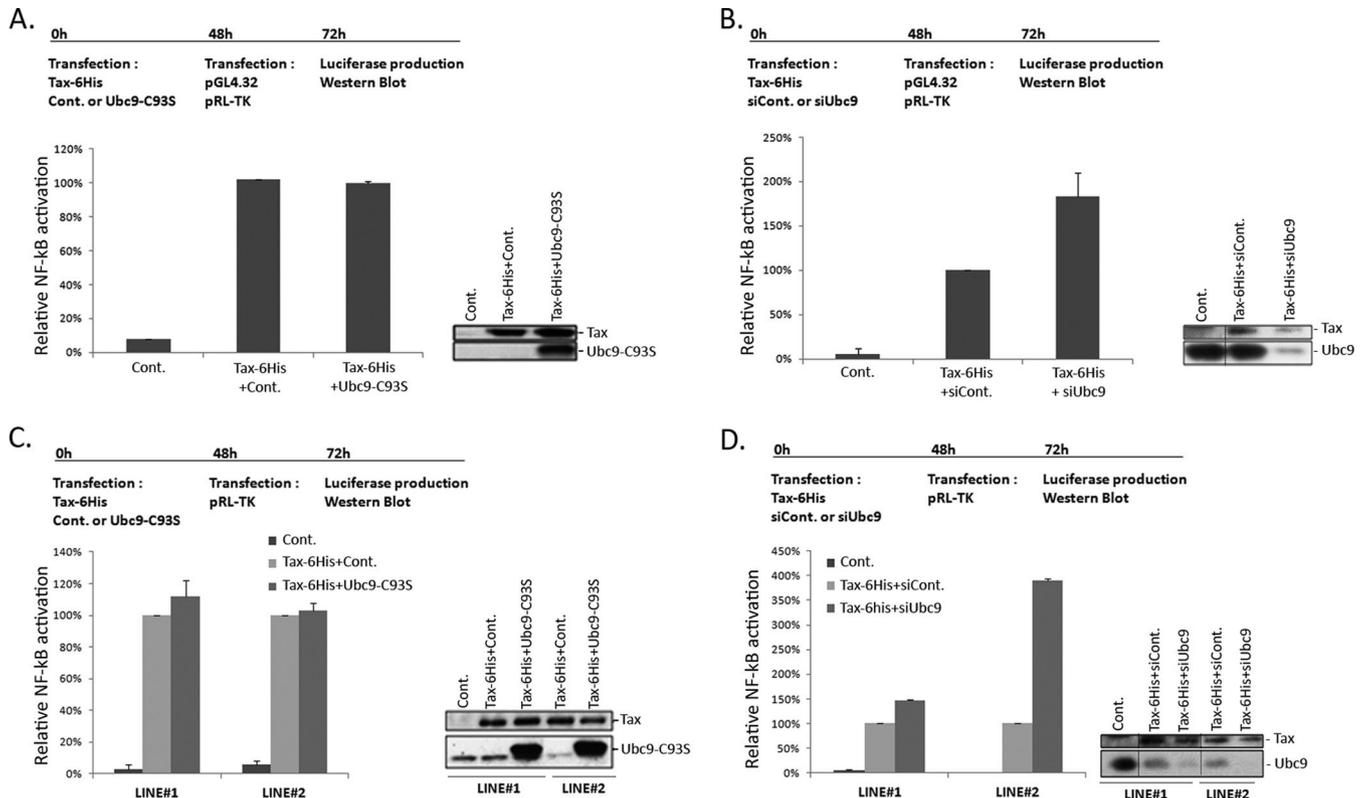


FIG 2 Non-SUMOylated Tax activates both transfected and integrated NF- κ B reporter constructs. Luciferase reporter assays were performed in 293T cells to analyze the ability of non-SUMOylated Tax to transactivate either a transfected (A and B) or an integrated (C and D) κ B reporter construct. (A and B) 293T cells were transfected with the Tax-6His construct and either the control or T7-Ubc9-C93S construct (A) or the control or Ubc9 siRNA (B) together with the pGL4.32 (κ B-Luc2P) construct and the pRL-TK normalization plasmid. (C and D) 293T cells containing the integrated κ B-Luc2P reporter construct were transfected with the Tax-6His construct and either the control or T7-Ubc9-C93S plasmid (C) or the control or Ubc9 siRNA (D) together with only the pRL-TK normalization plasmid. Data represent the Luc2P/*Renilla* ratio normalized to that of Tax alone (100%) and are the means and standard deviations from two independent experiments performed in duplicates. The outline of each experiment and the Western blot analyses showing Tax and Ubc9 expression are included in all panels.

negative control for ICAM-1 induction, cells were also transfected with the NF- κ B-defective Tax-M22 mutant (19). As shown in Fig. 3A (left side), ICAM-1 mRNA was induced by wild-type Tax but not by the M22 mutant, confirming that ICAM-1 induction by Tax in 293T cells indeed relied on NF- κ B pathway activation. Expression of neither Ubc9-C93S nor siUbc9 had an impact on the level of induction of ICAM-1 (Fig. 3A and B, left sides). Nickel pulldown experiments were performed on the same day as the RT-PCR analysis to evaluate the level of Tax SUMOylation (Fig. 3A and B, right sides). Compared to that in control cells, total inhibition of Tax SUMOylation was found in both cell expressing Ubc9-C93S (Fig. 3A, right sides, lanes 3 and 4) and siUbc9-treated cells (Fig. 3B, right sides, lanes 2 and 3). Western blot analyses showed potent expression of Ubc9-C93S and silencing of Ubc9 upon siRNA treatment (Fig. 3, right sides, lysates). In contrast, no signal was found for Tax in Western blotting (data not shown). This is very likely due to the fact that the Tax-6His plasmid was transfected at day 2 in already-transfected cells, reducing plasmid expression. However, Tax-6His was produced under each condition, as shown by the Tax signals detected by either RT-PCR or nickel pulldown.

Together with the above data, these findings provide the direct demonstration that non-SUMOylated Tax is as functional as wild-type Tax for NF- κ B promoter activation in adherent cells.

Non-SUMOylated Tax is also functional for NF- κ B promoter activation in T cells. Experiments were finally performed in T cells, which represent the preferential target cells of HTLV-1 *in vivo*. We used the MOLT4 T-cell line, in which acceptable level of transfection (around 20%) could be achieved. However, even with this optimized protocol, we were not able to detect the endogenous SUMOylation of Tax in these cells (data not shown). To facilitate the detection of SUMOylated Tax in T cells, the Tax-6His construct was transfected together with an HA-SUMO-3 plasmid (or HA-Ub as control), as previously described (7). Analysis of proteins purified upon nickel pulldown at 2 days posttransfection showed anti-HA-reactive products in cells transfected with the Tax-6His (Fig. 4A, lanes 2 and 4) but not the control (lane 1), validating the experiment. Expressing Tax-6His together with Ubc9-C93S abolished Tax conjugation to HA-SUMO-3 (Fig. 4A, lane 3) with no effect on the level of conjugation to HA-Ub (Fig. 4A, lane 5). Only partial reduction of Tax SUMOylation was observed upon treatment with the siUbc9 (data not shown).

Luciferase-based reporter assays were then performed in MOLT4 T cells. Cells were first transfected with the Tax-6His plasmid and the Ubc9-C93S construct to inhibit Tax SUMOylation prior to promoter transfection and then subjected to a second round of transfection 48 hours later with the reporter plasmids. Finally, luciferase activities were assessed after an additional 24-

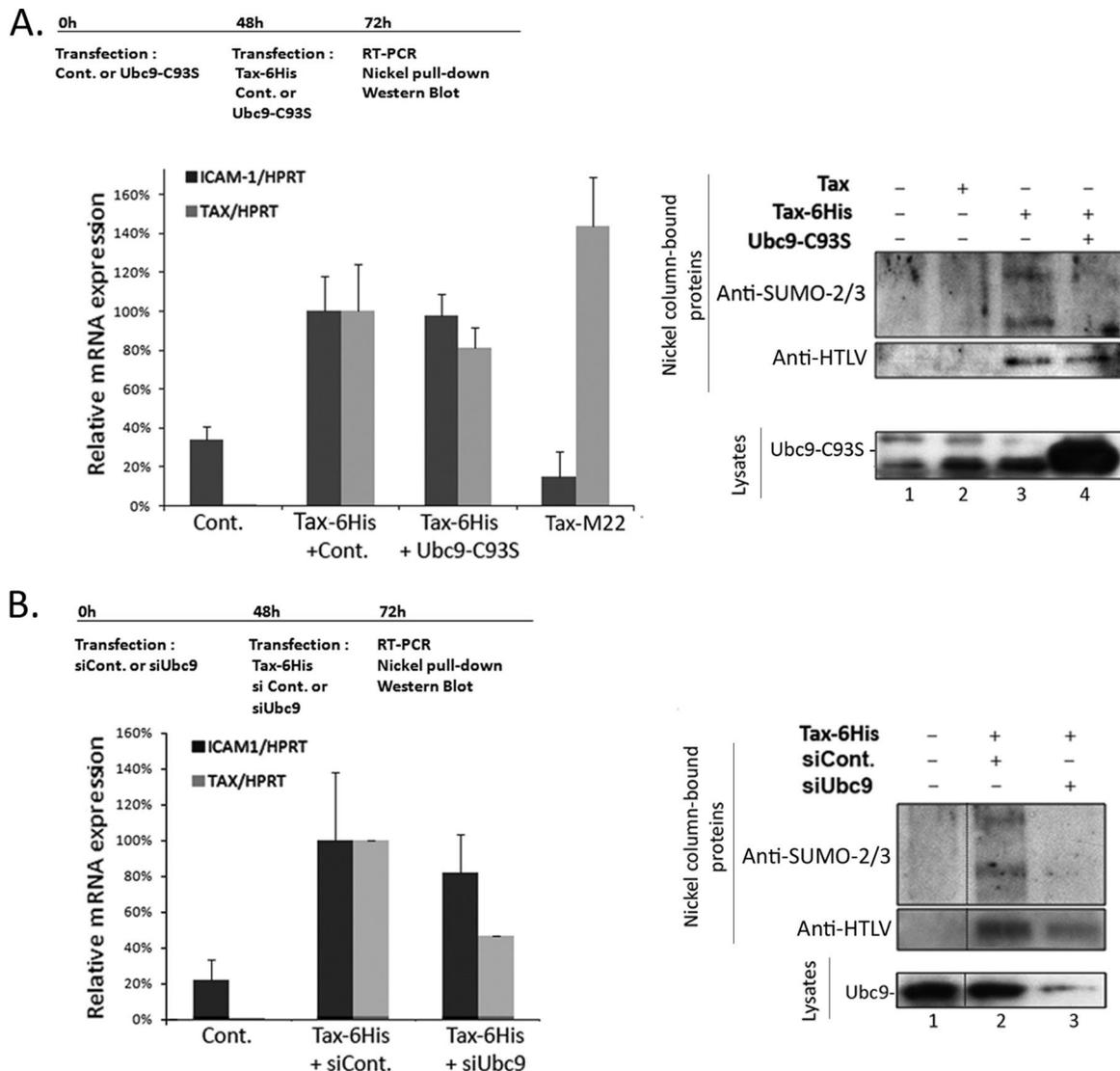


FIG 3 Non-SUMOylated Tax induces the expression of the NF- κ B regulated ICAM-1 gene. Real-time PCR experiments were performed in 293T cells to quantify ICAM-1 mRNA induction by Tax in the presence or absence of Ubc9-C93S or siUbc9. 293T cells were transfected with the control or T7-Ubc9-C93S construct (A) or the control or Ubc9 siRNA (B) and 48 h later with the Tax-6His plasmid, and total RNA was extracted after 24 h. For panel A the Tax-M22 mutant, which is defective for NF- κ B activation, was also included as a negative control for ICAM-1 induction. Left sides show the amount of Tax or ICAM-1 mRNA normalized to the amount of HPRT mRNA and are the means and standard deviations from at least two independent experiments performed in duplicates. Right sides show the level of Tax SUMOylation after purification of Tax-6His proteins (nickel column-bound proteins) and the level of expression of Ubc9 analyzed by Western blotting (lysates). The outline of each experiment is indicated at the top of each panel.

hour period. Compared to that in cells expressing Tax alone (set to 100%), a larger amount of luciferase was found in cells producing Tax-6His together with Ubc9-C93S (Fig. 4B). Western blot analyses confirmed similar levels of Tax expression under all conditions as well as strong expression of Ubc9-C93S (Fig. 4B, lysates).

These findings demonstrate that Tax SUMOylation is also dispensable for Tax-induced NF- κ B promoter activation in T cells.

DISCUSSION

Based on the analysis of an ubiquitinated but weakly SUMOylated Tax mutant still able to activate an NF- κ B reporter gene, we previously concluded that Tax SUMOylation is not required for Tax-induced NF- κ B pathway activation (12). However, this conclusion was challenged by other groups arguing that this residual level

of endogenous Tax SUMOylation could still represent an important functional determinant, presumably by targeting the nuclear population of Tax directly involved in transcription (13–15). Here, we set up a new strategy that relies not on Tax mutants but on the inhibition of the SUMOylation machinery via the targeting of the unique SUMO-conjugating enzyme Ubc9. This allowed us to show that Tax still activates NF- κ B-driven gene expression at a wild-type level in adherent cells in which Ubc9 is inactivated, resulting in total disappearance of either SUMO-1- or SUMO-2/3-conjugated Tax species. It is noteworthy that potent NF- κ B promoter activation by non-SUMOylated Tax was observed not only with a transfected NF- κ B reporter promoter but also with an integrated reporter construct as well as with an endogenous NF- κ B-regulated gene. This argues against a specific role of Tax

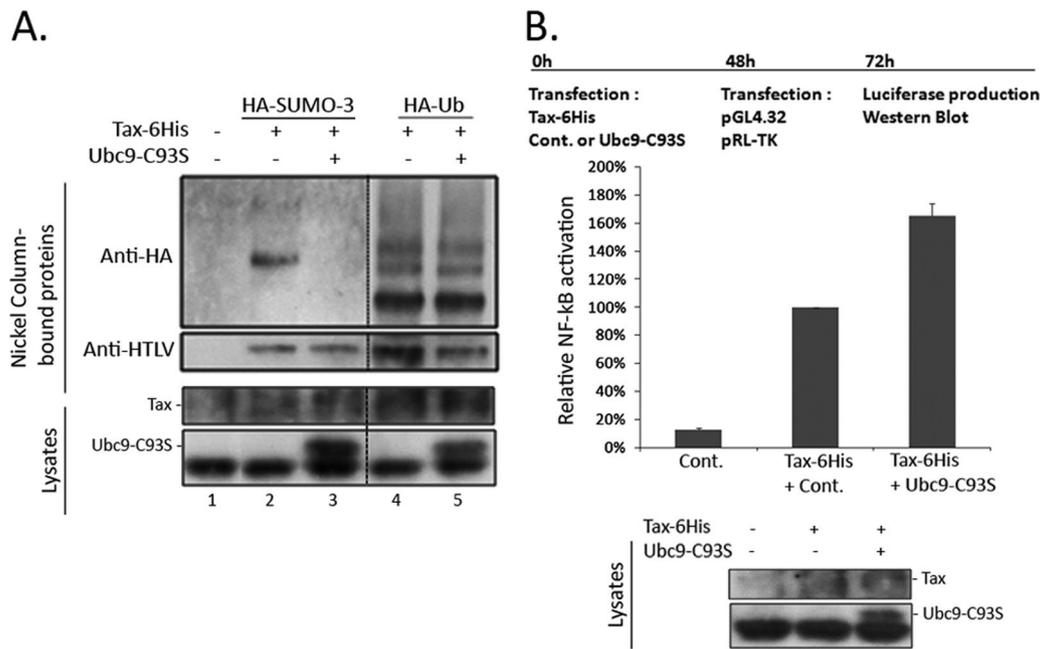


FIG 4 Non-SUMOylated Tax activates a NF- κ B promoter in T cells. (A) Nickel pull-down experiment to study the effect of Ubc9-C93S on Tax SUMOylation in T cells. MOLT4 T cells were transfected with the control or the Tax-6His plasmid together with either HA-SUMO-3 or HA-Ub and in the presence or absence of T7-Ubc9-C93S. Cells were lysed at 2 days posttransfection, and total proteins were either directly analyzed by Western blotting for Ubc9 and Tax expression (lysates) or purified by nickel pull-down (nickel column-bound proteins). Purified proteins were blotted successively with the anti-HA antibody and the HTLV-1 serum. (B) Luciferase reporter assays in MOLT4 T cells. Cells were first transfected with the Tax-6His construct and either the control or T7-Ubc9-C93S construct and then subjected to a second round of transfection 2 days later with the pGL4.32 (κ B-Luc2P) and pRL-TK reporter plasmids. Data represent the Luc2P/*Renilla* ratio normalized to that of Tax alone (100%) and are the means and standard deviations from two independent experiments performed in duplicates. The outline of the experiment and the Western blot analysis showing Tax and Ubc9 expression are also presented.

SUMOylation in Tax interaction with promoter regions in the context of chromatin.

Since the impact of SUMOylation may be cell type dependent (20), it was important to also examine how the loss of Tax SUMOylation affected Tax-induced NF- κ B activation in T cells, which constitute the natural target cells of HTLV-1. We found that expressing Tax together with Ubc9-C93S also abolished Tax SUMOylation in MOLT4 cells, showing that Tax SUMOylation is also under the control of Ubc9 in T cells. Furthermore, the absence of Tax SUMOylation also had no effect on the activation of a transfected NF- κ B promoter in MOLT4 T cells.

Interestingly, reporter assays performed in 293T cells showed that while little change was observed upon blocking the catalytic activity of Ubc9, Ubc9 silencing led to increased Tax-induced NF- κ B promoter activation. Moreover, expressing Ubc9-C93S in T cells also increased NF- κ B promoter activation by Tax. Our findings therefore indicate not only that Tax SUMOylation is dispensable for Tax-induced NF- κ B activation in adherent cells or T cells but that endogenous Ubc9 may exert a negative effect on this process via either a SUMOylation-dependent or -independent mechanism. It is noteworthy that Ubc9 has already been described to contribute to transcriptional repression mediated by several transcription factors via either SUMOylation-dependent (21) or -independent (22) mechanisms.

Another interesting issue is whether the SUMOylation of cellular proteins is required for Tax-induced NF- κ B pathway activation. We observed that blocking or silencing Ubc9 massively reduced not only Tax SUMOylation but also conjugation of transfected SUMO-3 to total proteins (Fig. 1C). This suggests that

de novo SUMOylation of cellular cofactors is not required for Tax-induced NF- κ B activation. However, since SUMOylated proteins may have long half-lives, we cannot exclude the possibility that cellular proteins SUMOylated prior to Ubc9 inhibition may contribute to NF- κ B activation by Tax.

In conclusion, we believe that this study clarifies the issue of the role of SUMOylation in regard to Tax by providing conclusive evidence that non-SUMOylated Tax proteins are still fully functional for NF- κ B promoter activation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Florence Margottin-Goguet for critical reading of the manuscript.

This work was funded by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité de Paris) and the Institut National du Cancer (InCA)/Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA). S.P. is supported by a grant from University Paris Diderot.

REFERENCES

- Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. 2012. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front. Microbiol.* 3:322. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00322>.
- Currer R, Van Duyn R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, Narayanan A, Kashanchi F. 2012. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front. Microbiol.* 3:406. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00406>.
- Kfoury Y, Nasr R, Journo C, Mahieux R, Pique C, Bazarbachi A. 2012. The multifaceted oncoprotein Tax: sub-cellular localization, post-translational modifications and NF- κ B activation. *Adv. Cancer Res.* 113: 85–120. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394280-7.00003-8>.
- Baldwin AS. 2012. Regulation of cell death and autophagy by IKK and

- NF- κ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol. Rev.* 246:327–345. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01095.x>.
5. Robek MD, Ratner L. 1999. immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* 73:4856–4865.
 6. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C. 2004. Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J. Virol.* 78:11823–11832. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.21.11823-11832.2004>.
 7. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de Thé H, Pique C, Bazarbachi A. 2006. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* 107:4021–4029. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-09-3572>.
 8. Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF- κ B activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 25:10391–10406. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.23.10391-10406.2005>.
 9. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. 2007. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF- κ B activation. *J. Virol.* 81:13735–13742. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01790-07>.
 10. Kfoury Y, Setterblad N, El-Sabban M, Zamborlini A, Dassouki Z, El Hajj H, Hermine O, Pique C, de Thé H, Saïb A, Bazarbachi A. 2011. Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 117:190–199. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-05-285742>.
 11. Fryrear KA, Guo X, Kerscher O, Semmes OJ. 2012. The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* 119:1173–1181. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-06-358564>.
 12. Bonnet A, Randrianarison-Huetz V, Nzounza P, Favre-Bonvin A, Pene S, Nedelec M, Chazal M, Waast L, Bazarbachi A, Mahieux R, Bénit L, Pique C. 2012. Low sumoylation and nuclear body formation do not prevent Tax-induced NF- κ B promoter activation in primary or HTLV-1-infected T cells. *Retrovirology* 9:77. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-77>.
 13. Zane L, Jeang KT. 2012. The importance of ubiquitination and sumoylation on the transforming activity of HTLV Tax-1 and Tax-2. *Retrovirology* 9:103. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-103>.
 14. Turci M, Lodewick J, Di Gennaro G, Rinaldi AS, Marin O, Diani E, Sampaio C, Bex F, Bertazzoni U, Romanelli MG. 2012. Ubiquitination and sumoylation of the HTLV-2 Tax-2B protein regulate its NF- κ B activity: a comparative study with the HTLV-1 Tax-1 protein. *Retrovirology* 9:102. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-102>.
 15. Shirinian M, Kfoury Y, Dassouki Z, El-Hajj H, Bazarbachi A. 2013. Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front. Microbiol.* 4:231. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00231>.
 16. Hay RT. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* 18:1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.012>.
 17. Gong L, Kamitani T, Fujise K, Caskey LS, Yeh ET. 1997. Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J. Biol. Chem.* 272:28198–28201. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.45.28198>.
 18. Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T. 2006. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 20:590–598. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404129>.
 19. Smith MR, Greene WC. 1990. Identification of HTLV-I tax transactivator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev.* 4:1875–1885. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.4.11.1875>.
 20. Treuter E, Venteclef N. 2010. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim. Biophys. Acta* 2:909–918. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.008>.
 21. Chen S, Yu X, Lei Q, Ma L, Guo D. 2013. The SUMOylation of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) by Ubc9 regulates its stability and transcriptional repression activity. *J. Cell. Biochem.* 114:2323–2333. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24579>.
 22. Tomoiu A, Gravel A, Tanguay RM, Flamand L. 2006. Functional interaction between human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and ubiquitin-conjugating enzyme 9 in the absence of sumoylation. *J. Virol.* 80:10218–10228. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00375-06>.

ANNEXE 2:

Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation

Amandine Bonnet, Voahangy Randrianarison-Huetz, Patrycja Nzounza, Martine Nedelec,
Maxime Chazal, Laetitia Waast, Sabrina Pene, Ali Bazarbachi, Renaud Mahieux, Laurence
Bénit and Claudine Pique

Retrovirology 2012 Sep 25 ; 9:77



RESEARCH

Open Access

Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation

Amandine Bonnet^{1,2,3}, Voahangy Randrianarison-Huetz^{1,2,3}, Patrycja Nzounza^{1,2,3}, Martine Nedelec^{1,2,3}, Maxime Chazal^{1,2,3}, Laetitia Waast^{1,2,3}, Sabrina Pene^{1,2,3}, Ali Bazarbachi⁴, Renaud Mahieux⁵, Laurence Bénit^{1,2,3} and Claudine Pique^{1,2,3*}

Abstract

Background: The Tax protein encoded by Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a powerful activator of the NF- κ B pathway, a property critical for HTLV-1-induced immortalization of CD4⁺ T lymphocytes. Tax permanently stimulates this pathway at a cytoplasmic level by activating the I κ B kinase (IKK) complex and at a nuclear level by enhancing the binding of the NF- κ B factor RelA to its cognate promoters and by forming nuclear bodies, believed to represent transcriptionally active structures. In previous studies, we reported that Tax ubiquitination and SUMOylation play a critical role in Tax localization and NF- κ B activation. Indeed, analysis of lysine Tax mutants fused or not to ubiquitin or SUMO led us to propose a two-step model in which Tax ubiquitination first intervenes to activate IKK while Tax SUMOylation is subsequently required for promoter activation within Tax nuclear bodies. However, recent studies showing that ubiquitin or SUMO can modulate Tax activities in either the nucleus or the cytoplasm and that SUMOylated Tax can serve as substrate for ubiquitination suggested that Tax ubiquitination and SUMOylation may mediate redundant rather than successive functions.

Results: In this study, we analyzed the properties of a new Tax mutant that is properly ubiquitinated, but defective for both nuclear body formation and SUMOylation. We report that reducing Tax SUMOylation and nuclear body formation do not alter the ability of Tax to activate IKK, induce RelA nuclear translocation, and trigger gene expression from a NF- κ B promoter. Importantly, potent NF- κ B promoter activation by Tax despite low SUMOylation and nuclear body formation is also observed in T cells, including CD4⁺ primary T lymphocytes. Moreover, we show that Tax nuclear bodies are hardly observed in HTLV-1-infected T cells. Finally, we provide direct evidence that the degree of NF- κ B activation by Tax correlates with the level of Tax ubiquitination, but not SUMOylation.

Conclusions: These data reveal that the formation of Tax nuclear bodies, previously associated to transcriptional activities in Tax-transfected cells, is dispensable for NF- κ B promoter activation, notably in CD4⁺ T cells. They also provide the first evidence that Tax SUMOylation is not a key determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

Keywords: Retrovirus, Leukemia, NF-kappaB, Ubiquitin, SUMO, Nuclear speckles

* Correspondence: claudine.pique@inserm.fr

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

²CNRS, UMR8104, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the agent of Adult T-cell Leukemia, a fatal hematopoietic malignancy due to the transformation of CD4⁺ T lymphocytes. The Tax regulatory viral protein plays a pivotal role in HTLV-1-induced T-cell transformation. Indeed, Tax triggers permanent T cell proliferation through a variety of mechanisms including promotion of cell cycle, deregulation of apoptosis and activation or repression of cellular gene promoters (reviewed in [1-4]). Notably, Tax is a powerful inducer of the NF- κ B pathway, an activity shown to be required for HTLV-1-induced immortalization of primary CD4⁺ T lymphocytes [5].

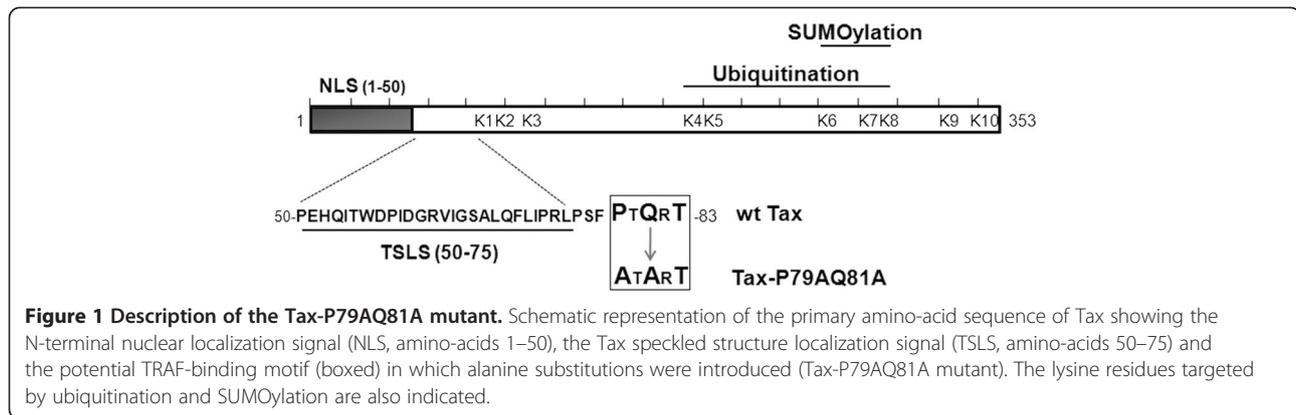
In physiological conditions, the NF- κ B pathway is transiently activated in response to extracellular stimuli (reviewed in [6]). These results in the activation of the cytoplasmic I κ B kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic subunits, IKK α and IKK β and a regulatory subunit, NF- κ B essential modulator (NEMO)/IKK γ . Once activated, IKK induces the phosphorylation and degradation of the NF- κ B inhibitors I κ B, liberating the NF- κ B factors which then translocate to the nucleus. Contrasting with the physiological situation, Tax is able to activate the NF- κ B pathway in a permanent manner by acting on both the cytoplasmic and nuclear phases. In the cytoplasm, Tax binds to NEMO [7] and recruits adaptor proteins and kinases that in turn promote IKK α/β activation ([8-11] and reviewed in [12]). In the nucleus, Tax binds to and stabilizes the binding of NF- κ B factors, including RelA/p65, to the NF- κ B dependent promoter [13,14]. In the nucleus, Tax also assembles into particular structures called Tax nuclear speckled structures or Tax nuclear bodies [15-17]. This was shown to depend upon the presence of an N-terminal region located between residues 50 to 75 of Tax (Tax speckled structure localization signal, TSLS) [18]. NF- κ B-mediated transcription may arise in these structures, since they contain components of the NF- κ B pathway such as p50, RelA/p65 and NEMO [16,19,20]. In addition, repression of cellular promoters was also associated with Tax nuclear bodies [21]. Tax nuclear bodies also contain components of splicing complexes [17] and DNA damage response machineries [22] and were, therefore, proposed to mediate other functions than transcription (reviewed in [23]).

In previous studies, we and others demonstrated that Tax is ubiquitinated and SUMOylated [20,24-26]. A series of studies focusing on the role of Tax ubiquitination demonstrated the critical role of this modification in NF- κ B activation. Indeed, reducing or increasing Tax ubiquitination by interfering with ubiquitination or deubiquitination enzymes was shown to block or enhance Tax-induced NF- κ B activation, respectively [27-30]. NF- κ B activation was associated with Tax conjugation to

K63-linked ubiquitin chains, which were shown to be essential for Tax binding to NEMO and IKK activation [30-32]. K63-linked ubiquitin chains also promote the targeting of Tax and NEMO to perinuclear spots associated to the centrosome and the Golgi apparatus, believed to represent a Tax-induced cytoplasmic signaling platform [32,33]. Tax SUMOylation was initially associated with nuclear events. Indeed, SUMO-1-conjugated Tax subpopulations were found in the nucleus and coexpressing Tax along with SUMO-1 was shown to increase the nuclear fraction of Tax. Moreover, SUMO-1 was found to colocalize with Tax in nuclear bodies [19,20,24].

Tax possesses 10 lysine residues (referred to as K1 to K10), among those K4 to K8 serve as targets for ubiquitination and K6 to K8 as targets for SUMOylation (Figure 1). We and others previously showed that mutating lysines K4 to K8 abolishes both Tax ubiquitination and SUMOylation and renders Tax inactive for RelA nuclear translocation, a defect restored by making a Tax ubiquitin fusion protein. Mutating only lysines among K6 to K8 still allows RelA nuclear translocation, but strongly reduces NF- κ B promoter activation, which is partially restored upon fusion to SUMO-1 [20,24]. These findings led to the proposition of a two-step working model in which K63 ubiquitination of Tax first intervenes in the cytoplasm to activate IKK and allows RelA nuclear translocation, while Tax SUMOylation is subsequently required for RelA-dependent promoter activation within Tax nuclear bodies. However, subsequent observations suggest a more complex picture. Indeed, it was reported that mono-ubiquitination in the nucleus activates the nucleocytoplasmic shuttling of Tax in stress conditions [34]. Moreover, fusing lysine Tax mutants to SUMO-1 was shown to enhance NEMO targeting to cytoplasmic perinuclear spots while fusing them to ubiquitin was shown to restore the formation of nuclear bodies [19]. In addition, RNF4, an ubiquitin ligase that preferentially ubiquitinates SUMOylated substrates, was recently reported to be involved in Tax ubiquitination [27]. These recent findings favor the notion that Tax ubiquitination and SUMOylation may mediate redundant rather than successive functions.

How Tax post-translational modifications and their impact on Tax localization are synchronized with NF- κ B activation is still unclear. Moreover, the importance of Tax post-translational modifications and nuclear bodies has not been investigated in CD4⁺ T cells yet. In this study, we revisited the role of Tax nuclear bodies and Tax SUMOylation on Tax activities. We confirm that Tax SUMOylation correlates with the formation of Tax nuclear bodies. We also demonstrate that, surprisingly, impaired nuclear body formation still allows Tax to fully activate a NF- κ B promoter in either cell lines or primary CD4⁺ T cells. In addition, we provide evidence that the



degree of Tax NF- κ B activity correlates with the level of Tax ubiquitination but not SUMOylation. These data provide the first direct evidence that Tax nuclear body formation and Tax SUMOylation are dispensable for Tax-induced NF- κ B activation.

Results

Tax-P79AQ81A, a Tax mutant defective for nuclear body formation

In the search for potential functional motifs in Tax, we selected a PxQxT sequence (aa 79–83) because this sequence fits with a putative motif for binding to the TRAFs (TNF-receptor associated factor), which are ubiquitin ligases acting in the NF- κ B pathway [35]. Interestingly, the PxQxT motif is also just adjacent to the TSLS (Figure 1), suggesting that it might be involved in the nucleocytoplasmic trafficking of Tax. It was previously shown that residues at position 1 and 3 of the PxQxT motif are the most critical for binding to the TRAFs [36]. Hence, a mutant in which the P79 and Q81 residues were changed to alanines (Tax-P79AQ81A, Figure 1) was generated to study the role of the PxQxT motif in Tax modifications and activities.

The subcellular localization of wild-type (wt) Tax and Tax-P79AQ81A was first compared in HeLa cells (Figure 2A). As previously described [24], wt Tax was detected both in the cytoplasm and in the nucleus, where it formed well visible nuclear bodies (NB) (67% of the cells). A dramatic change in nuclear localization was found for Tax-P79AQ81A since Tax-P79AQ81A was present in the nucleus as diffuse staining in all transfected cells, and very few and very small nuclear bodies were detected in only 8% of the cells while 92% of Tax positive cells did not show any nuclear bodies (Figure 2A). A dramatic reduction in nuclear body formation by Tax-P79AQ81A was also found in transfected 293 T cells and more importantly, in transfected CEM T cells (less than 10% of the cells, Figure 2B and 2C).

Hence, mutations of the P79 and Q81 residues do not alter the nuclear import of Tax, but preclude Tax nuclear

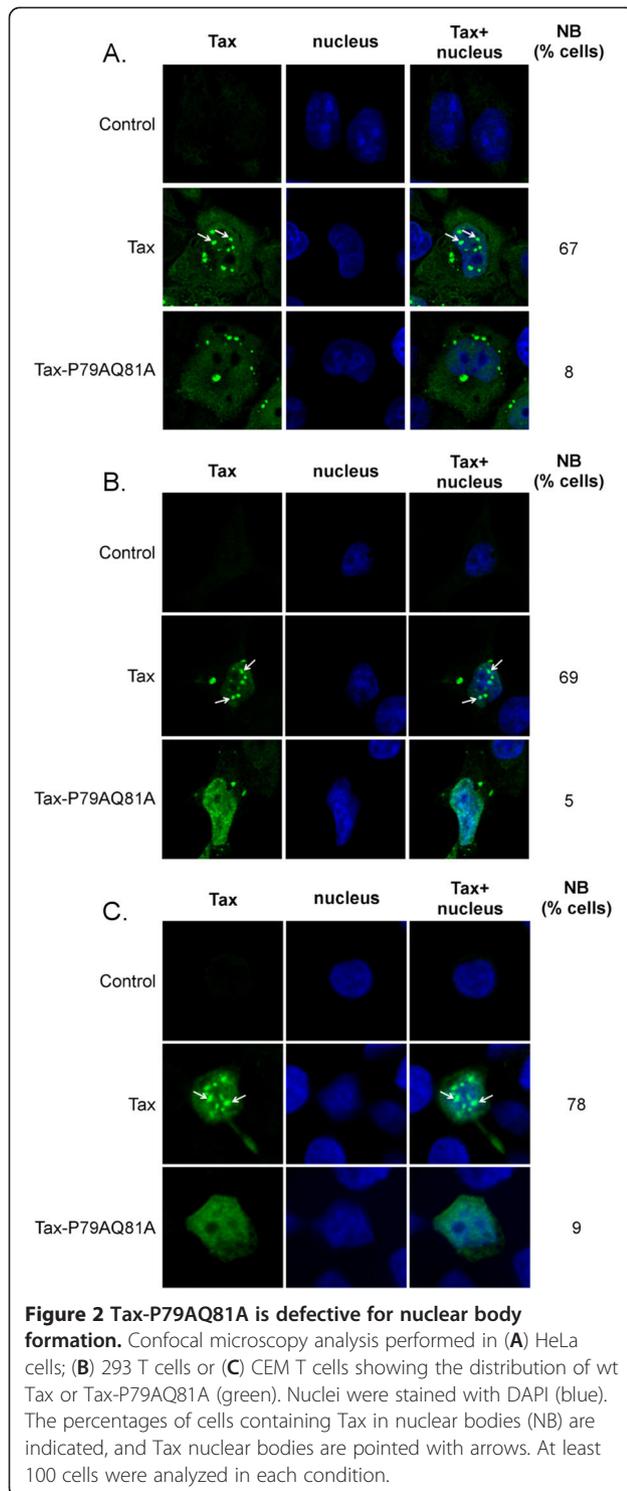
body formation. This confirms the importance of the TSLS-containing N-terminal region of Tax in nuclear body formation and suggests that the P79 and Q81 residues are part of this nuclear body targeting signal.

Tax-P79AQ81A properly activates the cytoplasmic steps of the NF- κ B pathway

In the cytoplasm, Tax binds to NEMO and activates the IKK complex, a process that requires the targeting of both Tax and IKK to perinuclear spots (PS) [32,33]. In immunoprecipitation assays, we confirmed that wt Tax coprecipitated endogenous NEMO and induced the phosphorylation of IKK α / β (Figure 3A, lane 2). Tax-P79AQ81A also properly coprecipitated with endogenous NEMO and induced the phosphorylation of IKK α / β (Figure 3A, lane 3). In contrast, and as expected from earlier data [7], neither NEMO binding nor IKK activation was observed for the NF- κ B-defective M22 mutant (Figure 3A, lane 4).

A cell fractionation procedure described for the purification of cytoplasmic aggresomes, which are centrosomal-associated insoluble structures containing ubiquitinated proteins [37], was used next to study Tax and NEMO targeting to perinuclear spots. Comparable amounts of wt Tax and Tax-P79AQ81A were found in the insoluble fractions, indicating that both proteins were similarly targeted to cytoplasmic aggresomes (Figure 3B, Tax panel, lanes 5 and 6). Similar enrichment of NEMO was observed in the insoluble fraction of cells expressing either wt Tax or Tax-P79AQ81A (Figure 3B, NEMO panel, lanes 5 and 6), as compared to mock transfected cells (lane 4), indicating that both Tax proteins were equally efficient to relocalize NEMO to cytoplasmic aggresomes.

Confocal microscopy experiments further showed that endogenous NEMO was targeted to perinuclear spots in almost 100% of Tax-positive cells regardless of whether the cells had they produced wt Tax or Tax-P79AQ81A (Figure 3C). Wt Tax was also concentrated in perinuclear spots in 76% of cells as compared to 49% of Tax-P79AQ81A-expressing cells (Figure 3C). Of note, this



difference was due to the reduction of the cell population containing Tax-P79AQ81A in both perinuclear spots and nuclear bodies while the proportion of cells containing Tax only in perinuclear spots was comparable between Tax-P79AQ81A and wt Tax (Additional file 1: Figure S1).

Since the final consequence of IKK activation is the nuclear translocation of RelA, we analyzed the localization of endogenous RelA in Tax-expressing cells (Figure 3D). While RelA was found in the cytoplasm of Tax-negative cells, it was clearly relocated to the nucleus in the totality of cells expressing either wt Tax or Tax-P79AQ81A. Interestingly, the pattern of RelA mirrored that of Tax since while RelA was found in nuclear bodies in cells producing wt Tax, it was detected as a diffuse staining in cells producing Tax-P79AQ81A (Figure 3D).

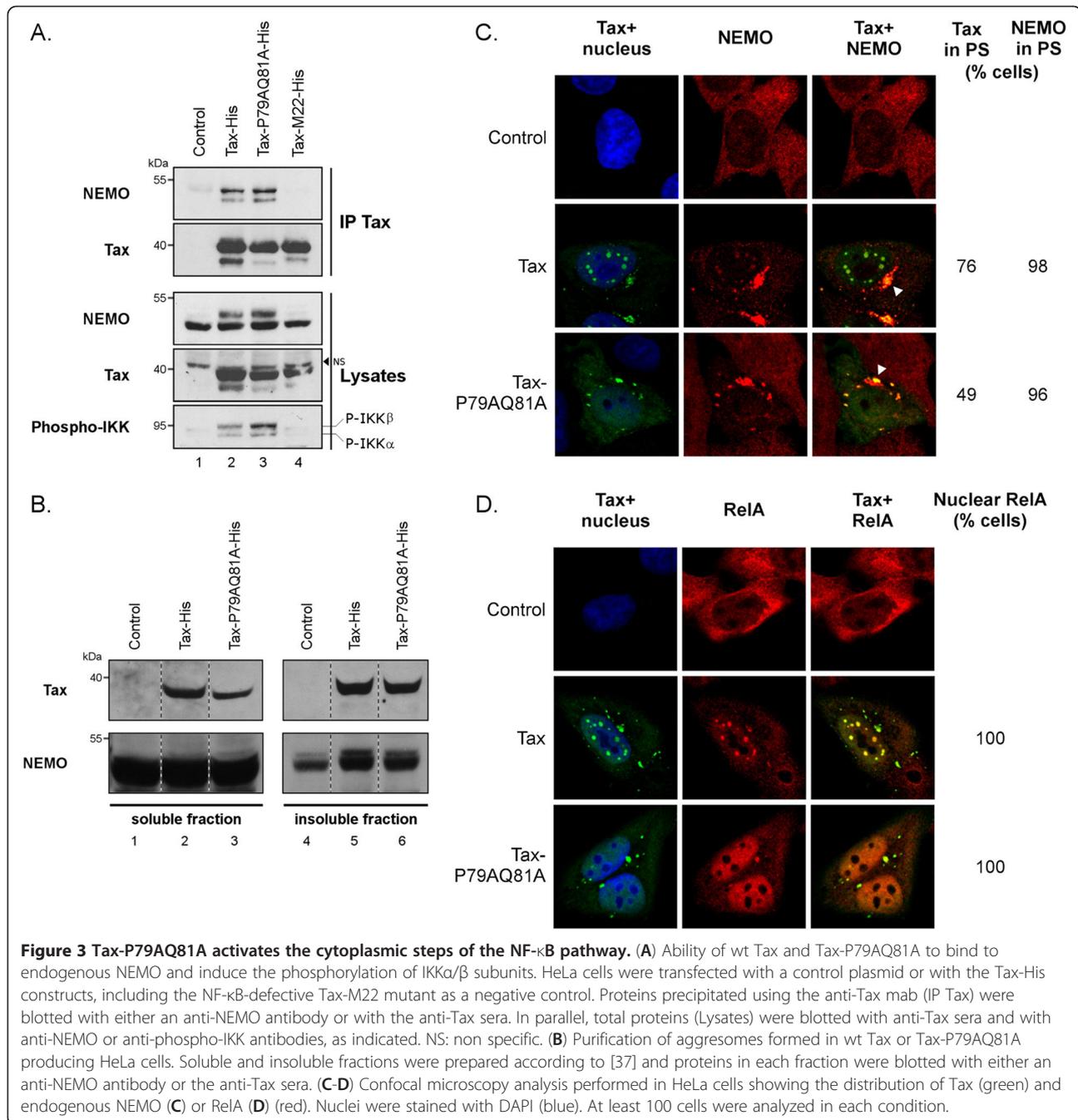
These results demonstrate that Tax-P79AQ81A properly activates the cytoplasmic steps of the NF- κ B pathway and induces nuclear RelA translocation in absence of nuclear body formation.

Tax-P79AQ81A is as active as wt Tax for NF- κ B promoter activation

Nuclear body formation was proposed to facilitate activation of the NF- κ B pathway at the nuclear level. Whether Tax-P79AQ81A is able to drive gene expression from a NF- κ B promoter was, therefore, investigated. NF- κ B reporter gene assays performed in HeLa (Figure 4A) and 293 T cells (Figure 4B) showed no significant difference ($p > 0.05$) between the NF- κ B promoter transactivation levels of wt Tax and Tax-P79AQ81A. The same experiments were performed in T cells, including the CEM T cell line (Figure 4C) and primary CD4⁺ T cells (Figure 4D). In both T cell systems, Tax-P79AQ81A was also fully able to transactivate the NF- κ B promoter. Furthermore, Tax-P79AQ81A transactivated a CREB promoter similarly to wt Tax in all cell types, confirming that the protein was functional (Additional file 2: Figure S2A-D). In all reporter gene assays, Tax-M22, defective for NF- κ B activation and Tax-M47, defective for CREB activation, were included as controls. Hence, while it is unable to form nuclear bodies, Tax-P79AQ81A is fully active in term of NF- κ B promoter activation in both adherent cells and T cells, including primary CD4⁺ T cells.

Tax nuclear bodies are hardly detected in HTLV-1-infected T cells

The previous findings, suggesting that absence of nuclear bodies did not alter Tax-induced NF- κ B activation, prompted us to investigate the status of nuclear bodies in HTLV-1-infected T cells. Confocal microscopy experiments were performed in two HTLV-1-infected T cell lines, C8166 cells that contain defective HTLV-1 proviruses still allowing Tax production [38] and HUT-102 cells, which contain wt proviruses and produce viral particles [39]. To facilitate the observation of Tax-positive cells, C8166 and HUT-102 cells were first mixed with uninfected CEM T cells, giving therefore the background



signal. Strikingly, while we used the same procedure that allows easy detection of nuclear bodies in transfected T cells, Tax nuclear bodies were found in less than 8% of the two HTLV-1-infected T cells (Figure 5). Importantly, NEMO-enriched perinuclear spots were clearly visible in both C8166 and HUT-102 cells (Figure 5, arrow heads), indicating IKK relocalization by endogenous Tax. Moreover, high luciferase production was detected upon transfection of the pNF- κ B-luciferase reporter plasmid in these cells (data not shown).

These results show that Tax, endogenously produced in HTLV-1-infected T cells, does not form nuclear bodies, although it is fully able to activate the NF- κ B pathway.

Tax-induced NF- κ B promoter activation correlates with the level of Tax ubiquitination but not the level of Tax SUMOylation

Since Tax nuclear bodies were previously linked to Tax SUMOylation, we analyzed the post-translational modifications of Tax-P79AQ81A. Purification of wt Tax

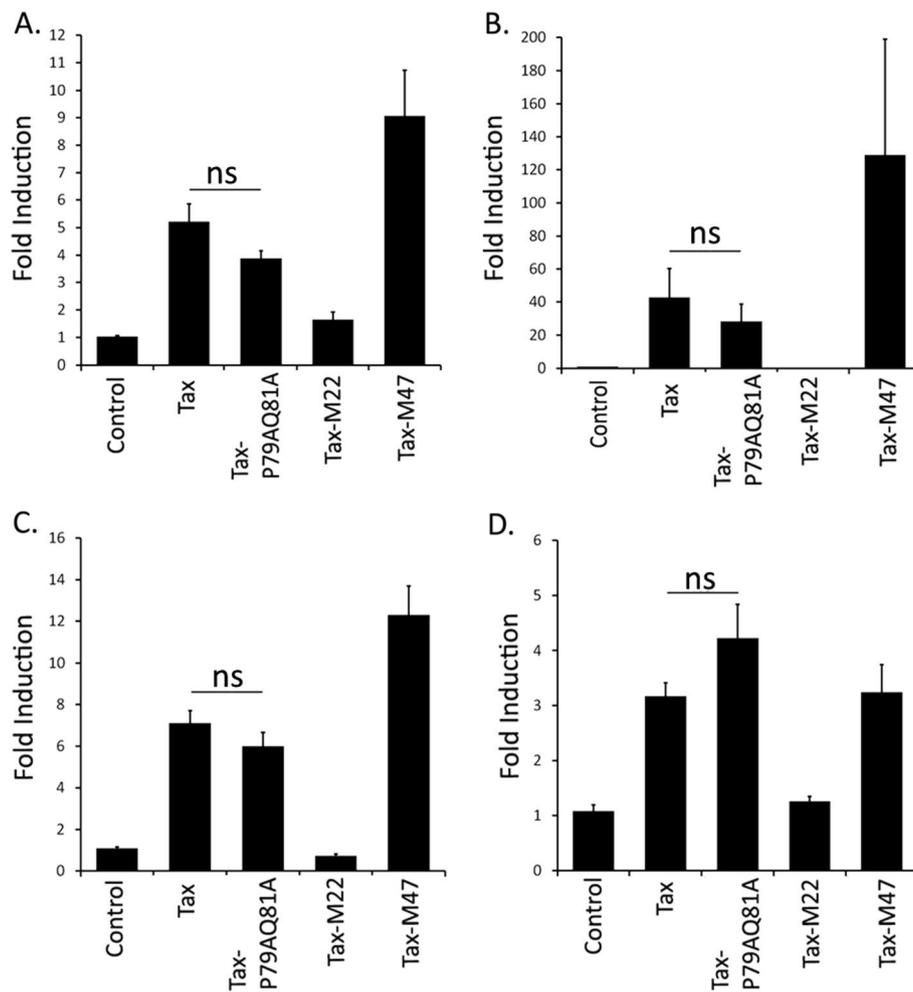
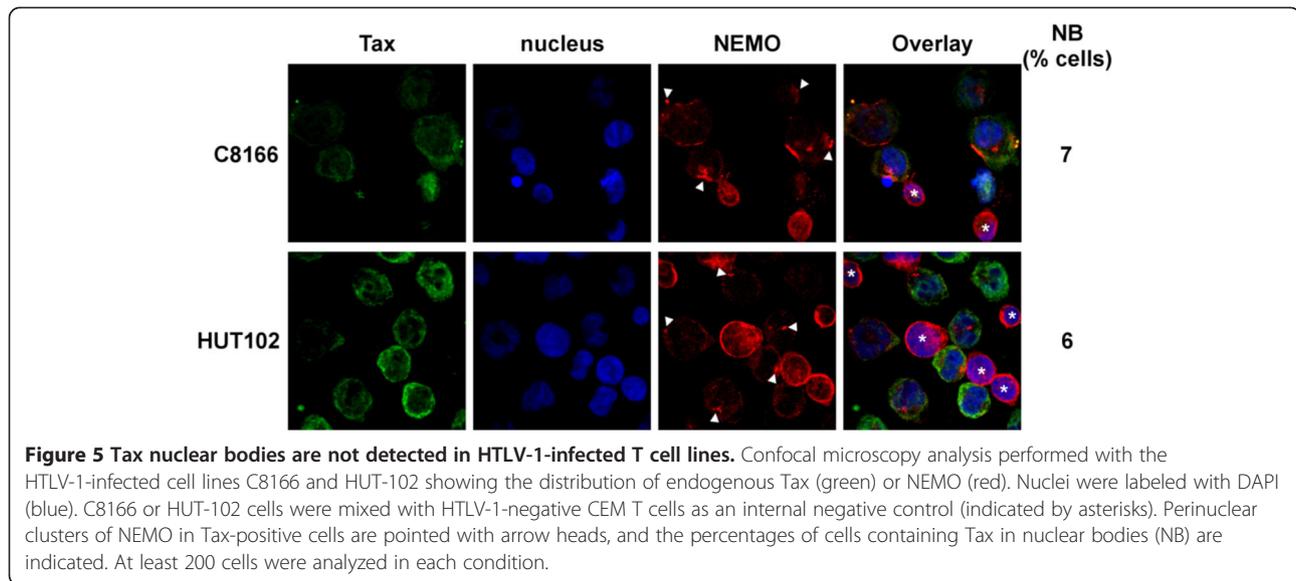


Figure 4 Tax-P79AQ81A properly activates a NF- κ B promoter in either cell lines or primary CD4⁺ T cells. NF- κ B promoter activity in Tax-transfected HeLa cells (A), 293 T cells (B), CEM T cells (C), and primary CD4⁺ T cells (D). Cells were transfected with a control plasmid or with the Tax-His constructs along with the NF- κ B reporter plasmid and the Renilla luciferase expression plasmid for normalization. To validate the experiments, the M22 (defective for the NF- κ B pathway) and M47 (defective for the CREB pathway) mutants were included in each experiment. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the firefly/renilla ratio obtained with the control plasmid. The results represent the means and standard error of the means (SEM) from at least four independent experiments performed in duplicates. ns: not statistically significant.

and the mutant was performed in a highly denaturant guanidine-containing buffer in order to avoid co-purification of non-covalently bound partners. Blotting the purified proteins with a pool of sera from HTLV-1-infected individuals revealed comparable amounts of modified Tax products between wt Tax and Tax-P79AQ81A (39% and 49% of total Tax respectively, Figure 6A).

The conjugation of wt Tax and Tax-P79AQ81A to either endogenous ubiquitin or SUMO was next examined. Wt Tax and Tax-P79AQ81A were conjugated to endogenous ubiquitin (Figure 6B) and more importantly to endogenous K63-linked ubiquitin chains (Figure 6C) at similar levels. Considering that K63-linked ubiquitin chains were shown to be critical for Tax interaction with NEMO, these results are consistent with our data

showing that Tax-P79AQ81A binds to NEMO like wt Tax. Contrasting with the level of ubiquitination, Tax-P79AQ81A displayed a severe reduction (78%) in conjugation to endogenous SUMO compared to wt Tax (Figure 6D). This reduction of SUMOylation was confirmed by experiments in which Tax or Tax-P79AQ81A was expressed together with a HA-SUMO-1 construct (Figure 6E). In all the pull-down experiments, wt Tax and Tax-P79AQ81A were expressed and purified at similar levels (Figure 6A-E, Tax panel). Hence, Tax-P79AQ81A is properly ubiquitinated, in particular with K63-linked ubiquitin chains, but is barely SUMOylated. Nevertheless, this mutant is fully able to transactivate a NF- κ B promoter, suggesting that SUMOylation is not essential for Tax-induced NF- κ B activation.



To further analyze the relationship between Tax SUMOylation and NF- κ B promoter activation, the properties of Tax-P79AQ81A were compared to those of the previously described lysine Tax mutants [24]. NiNTA pulldowns were performed in 293 T cells, in which protein expression is higher than in HeLa cells, ensuring fine quantification. Similarly to what we found in HeLa cells, Tax-P79AQ81A was properly ubiquitinated but barely SUMOylated in 293 T cells (Figure 7A). The lysine Tax mutants displayed the previously identified phenotypes: defect in both ubiquitination and SUMOylation (Tax-K1-10R, Tax-K4-8R), reduced ubiquitination and lack of SUMOylation (Tax-K6-8R, Tax-K7-8R) and low SUMOylation with only a slight reduction in ubiquitination (K7R) (Figure 7A). Interestingly, this latter pattern is very similar to that of Tax-P79AQ81A. In agreement with our previous studies [24], strong impact of lysine mutations on NF- κ B activity of Tax was observed (Figure 7B, upper panel). Tax-K6-8R and Tax-K7-8R showed low NF- κ B activity (Figure 7B) but wt level of CREB promoter activation (Additional file 2: Figure S2E), confirming their specific defect in NF- κ B activation. NF- κ B reporter gene assays further showed only a slight reduction in the NF- κ B activity of Tax-K7R (Figure 7B), which mirrored its slight reduction in ubiquitination (Figure 7A). Furthermore, when the levels of modifications for each mutant were plotted against the level of NF- κ B activities, a linear relation was clearly observed between Tax-induced NF- κ B promoter activation and Tax ubiquitination ($R^2 = 0.94$) but not Tax SUMOylation ($R^2 = 0.73$) (Figure 7C).

Tax ubiquitination is believed to govern Tax binding to NEMO and thereby, IKK activation. Indeed, non-conjugable lysine Tax mutants fail to bind to NEMO

[24], and the same defect is observed upon silencing of Ubc13, the ubiquitin conjugating enzyme shown to mediate Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains [30]. We further assessed the role of Tax ubiquitination on NEMO binding by analyzing the ability of the mutants used above to bind to either endogenous NEMO or endogenous phospho-IKK α/β (Figure 7D). Like for NF- κ B promoter activation, a linear relation was found between the amount of phospho-IKK associated to Tax and Tax ubiquitination ($R^2 = 0.94$) but not SUMOylation ($R^2 = 0.58$) (Figure 7E). These results provide direct evidence that ubiquitinated Tax is the species that binds to IKK and triggers IKK activation.

Altogether these data demonstrate that low SUMOylation does not prevent Tax-induced NF- κ B activation and that Tax ubiquitination is the predominant determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

Fusion of SUMO-1 increases the ubiquitination of Tax-P79AQ81A

We previously reported that fusing SUMO-1 to certain lysine Tax mutants partially rescued their ability to form nuclear bodies [24]. We thus wondered whether fusion of SUMO-1 to Tax-P79AQ81A could restore its nuclear body localization. Fusion of SUMO-1 to wt Tax increased the proportion of cells containing Tax nuclear bodies, as previously described [20,24] (98% of total NB (NB and NB + PS) for Tax-SUMO-1 as compared to 67% for non-fused Tax). A higher proportion of cells containing nuclear bodies was also observed upon SUMO-1 fusion to Tax-P79AQ81A (69% for Tax-P79AQ81A-SUMO-1, as compared to 8% for Tax-P79AQ81A). However, these nuclear bodies were less numerous (usually 2 to 3 per nucleus) than in the case of wt Tax and were

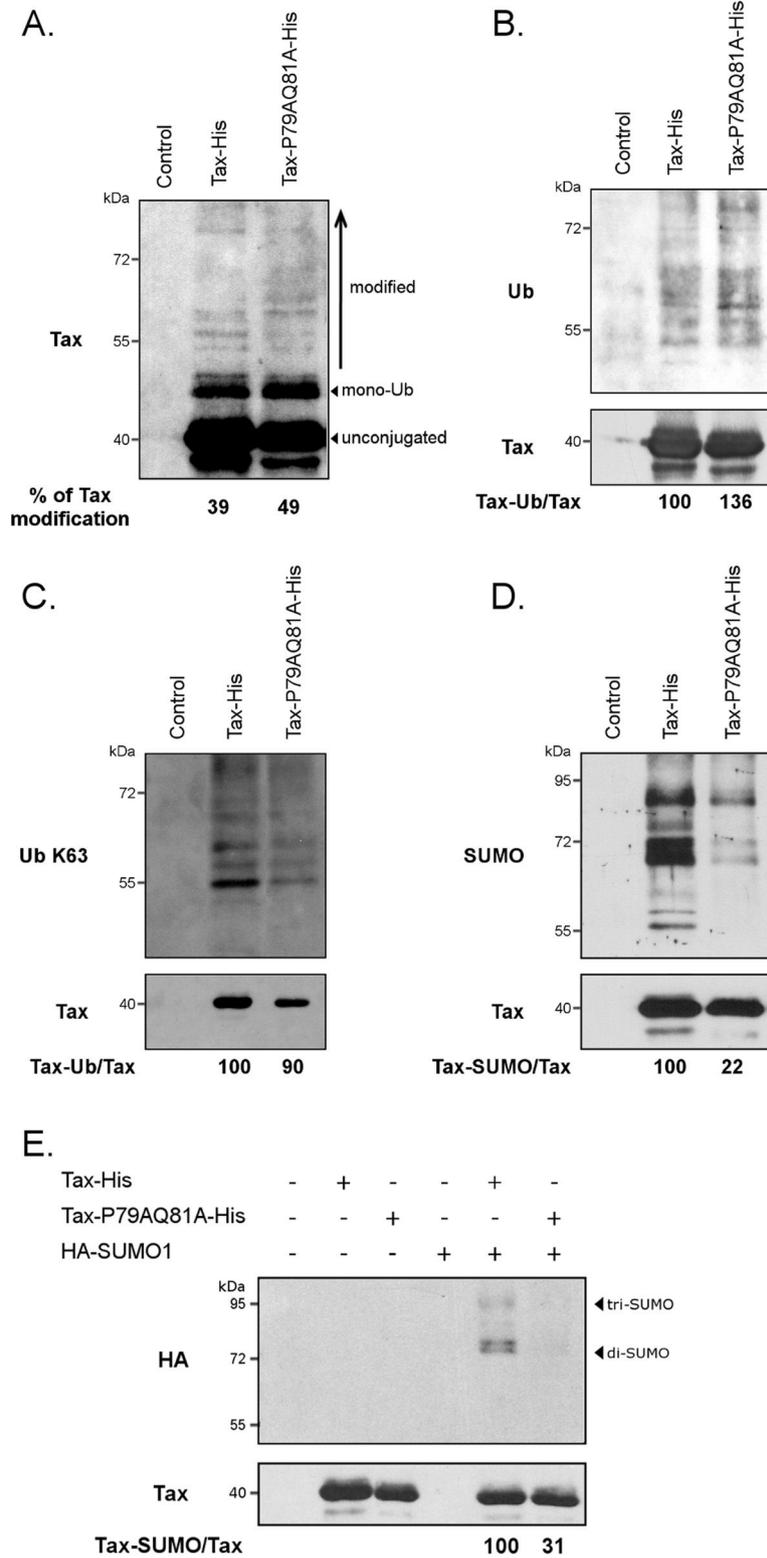


Figure 6 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 6 Tax-P79AQ81A is defective for SUMOylation. NiNTA experiments performed in HeLa cells showing the total level of Tax modifications (A), or the amounts of Tax products conjugated to endogenous total ubiquitin (B), endogenous K63-linked ubiquitin chains (C), endogenous SUMO (D) or overexpressed HA-SUMO-1 (E) for either wt Tax and Tax-P79AQ81A. (A-D) HeLa cells were transfected with a control plasmid or each of the Tax-His constructs and in (E) along with a HA-SUMO-1 construct. Tax proteins purified using nickel columns were revealed with anti-Tax sera or with anti-Ubiquitin, anti-K63-linked ubiquitin chains, anti-SUMO-2/3 or anti-HA antibodies, as indicated. The percentage of Tax modification was calculated by dividing the amount of high molecular weight Tax products by the amount of total Tax (modified + unconjugated). The percentages of ubiquitinated or SUMOylated Tax were normalized on the amount of unconjugated Tax (Tax-Ub/Tax) and expressed in comparison to wt Tax (100%).

much smaller than those formed by wt Tax (Figure 8A). Moreover, the recruitment of RelA within these small nuclear bodies were only seen in 11% of nuclear bodies-containing cells, showing that fusion of SUMO-1 did not allow the formation of nuclear bodies with wild-type phenotype (Figure 8A). Confocal experiments also showed that fusion of SUMO-1 slightly decreased the number of cells containing Tax in perinuclear spots, an effect observed for both wt Tax (63% of Tax-SUMO-1 expressing cells as compared to 77% of wt Tax expressing cells) and Tax-P79AQ81A (33% of Tax-P79AQ81A-SUMO-1 expressing cells as compared to 51% of Tax-P79AQ81A expressing cells). Moreover, an increased cytosolic staining was observed for both wt Tax-SUMO-1 and Tax-P79AQ81A-SUMO-1, as compared to their non-fused counterparts.

To confirm this, cell fractionation experiments were performed, in which cell extracts were separated in soluble cytosolic, intermediate (containing the perinuclear spots) and nuclear fractions, as previously described [32] (Figure 8B, upper panel). Quantification of the amounts of Tax in all three fractions (total, lower panel) revealed that the total amounts of Tax-SUMO-1 or Tax-P79AQ81A-SUMO-1 were increased compared to their respective non-fused counterpart. This increase was due to higher amounts of either Tax-SUMO-1 or Tax-P79AQ81A-SUMO-1 in the cytosolic fraction (lower panel) with few changes in the two other fractions (quantification not shown). This confirms the confocal microscopy observations (Figure 8A) and suggests that fusion of SUMO-1 stabilizes Tax in the cytosol.

Since Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains was correlated to the cytoplasmic localization of Tax [32], we compared the levels of ubiquitination of fused and non-fused proteins (Figure 8C). Strikingly, we found that fusion of SUMO-1 increased the conjugation to K63-linked ubiquitin chains of Tax-P79AQ81A but not of wt Tax.

Altogether these results indicate that fusion of SUMO-1 only partially rescues the formation of nuclear bodies by Tax-P79AQ81A. Moreover, they reveal an unexpected effect of the SUMO-1 fusion that stabilizes wt Tax and Tax-P79AQ81A in the cytosol and increases the ubiquitination of the mutant.

Discussion

In this study, we directly analyzed the role of Tax nuclear bodies and Tax SUMOylation on NF- κ B activation.

Previous studies have described that Tax forms nuclear spots called Tax nuclear bodies or Tax speckled structures [16,17]. A Tax speckled structure localization signal (TSLS) positioned between residues 50 and 75 was subsequently mapped in the Tax sequence [18]. In order to identify new functional motifs of Tax, we selected the PxQxT motif at position 79–83 because it fits with a TRAF-binding motif and is adjacent to the TSLS. We found that this motif does not control Tax interaction with the TRAF since its mutation alters neither Tax ubiquitination (this study) nor the co-precipitation of Tax with either TRAF2 or TRAF5 (data not shown). In contrast, mutations of the P79 and Q81 residues dramatically reduce the formation of Tax nuclear bodies, confirming the role of the TSLS and showing that this sequence includes the PxQ motif.

We and others have demonstrated that Tax ubiquitination, especially conjugation to K63-linked ubiquitin chains, permits Tax binding to NEMO [24,30,32]. Here we report that Tax-P79AQ81A, which is conjugated to either total ubiquitin or K63-linked ubiquitin chains at the same level than wt Tax, binds to NEMO and activates IKK like wt Tax. Moreover, analysis of a series of Tax mutants allowed us to show that the amount of endogenous phospho-IKK α/β coprecipitated with Tax correlates with the level of Tax ubiquitination but not SUMOylation. These findings confirm the critical role of Tax ubiquitination in NEMO binding and IKK activation and also demonstrate that Tax SUMOylation is dispensable for these processes. Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains was also shown to relocalize Tax and NEMO to perinuclear spots [32,33]. However, recent findings showed that NEMO targeting to perinuclear spots is also impaired upon siRNA-mediated SUMO silencing [19]. Using both microscopy analysis and cell fractionation, we found that endogenous NEMO is recruited in perinuclear spots at the same level in cells producing either wt Tax or Tax-P79AQ81A. Hence, lowering Tax SUMOylation has no effect on NEMO targeting to cytoplasmic spots. The effect of SUMO silencing could be explained by the role of a minor fraction of

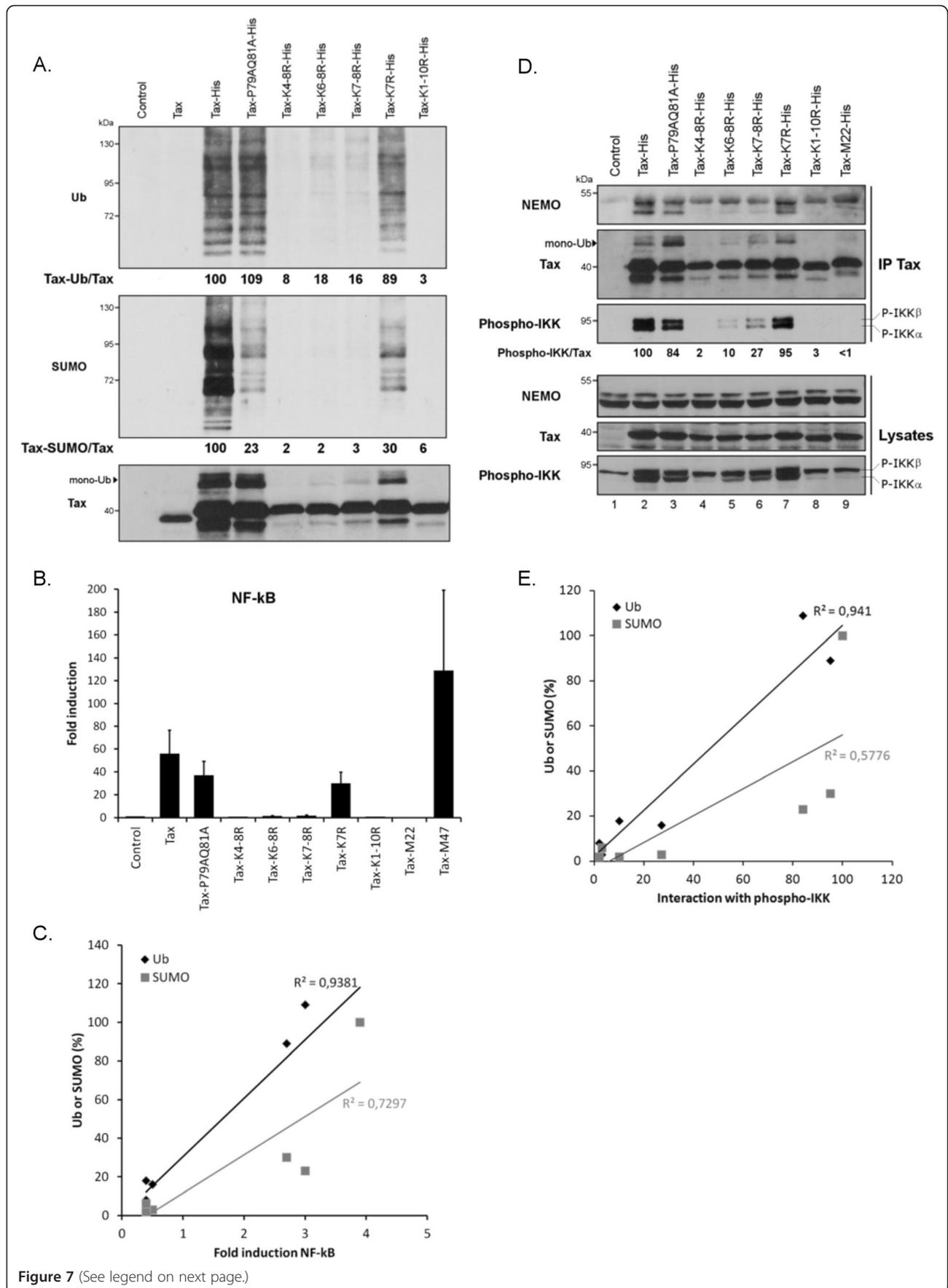


Figure 7 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 7 The degree of Tax NF- κ B activity correlates with the levels of Tax ubiquitination but not SUMOylation. (A) NiNTA experiments performed in 293 T cells showing the levels of Tax conjugation to endogenous ubiquitin or SUMO. 293 T cells were transfected as indicated and proteins purified on Nickel columns were revealed using anti-Ubiquitin, anti-SUMO-2/3 or the anti-Tax sera. The percentages of ubiquitinated or SUMOylated Tax were normalized on the amount of unconjugated Tax and expressed in comparison to wt Tax (100%). (B) NF- κ B reporter assay in 293 T cells. Cells were transfected with control or Tax-His constructs along with the NF- κ B or the Renilla luciferase plasmid for normalization. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the ratio of the control plasmid. Results represent the means and standard error of the means (SEM) from three independent experiments performed in duplicates. (C) The level of either ubiquitination or SUMOylation of the Tax mutants was plotted against their NF- κ B activities. The regression line shows a correlation between Tax NF- κ B activity and ubiquitination (determination coefficient = 0.94) but not SUMOylation (determination coefficient = 0.73). (D) Association of the Tax proteins to the IKK complex in 293 T cells. Total proteins (Lysates) or proteins precipitated using the anti-Tax mab (IP Tax) were blotted with anti-NEMO, anti-phospho-IKK or the anti-Tax sera, as indicated. (E) The regression line shows a correlation between Tax binding to phospho-IKK α / β and ubiquitination (determination coefficient = 0.94) but not SUMOylation (determination coefficient = 0.58).

SUMOylated Tax or of a SUMOylated unknown substrate in the cytoplasmic targeting of NEMO.

Tax nuclear bodies were previously reported to contain RelA and NEMO and therefore identified as transcriptionally active structures [16,19,20]. Surprisingly, we found that lack of nuclear body formation by Tax-P79AQ81A does not prevent this mutant from activating both the cytoplasmic and nuclear steps of the NF- κ B pathway. Importantly, such proper NF- κ B promoter activation was observed not only in adherent cells but also in T cells, notably CD4⁺ primary T cells. The composition of Tax nuclear bodies has essentially been studied in transfected adherent cells [15-17], and we were indeed able to detect these structures in all transfected cells, including T cells. However, using the same staining procedure, we observed that Tax nuclear bodies are nearly absent in HTLV-1-infected T cells. Hence, Tax nuclear bodies appear to be visible when Tax is transiently produced but not in an endogenous situation. This may suggest that nuclear bodies represent a storage compartment rather than transcriptionally active structures. However, it cannot be excluded that small clusters of Tax, undetectable by confocal microscopy, are indeed formed in HTLV-1-infected T cells. Further investigations are therefore needed to clarify the pattern and role of nuclear Tax, in particular in HTLV-1-infected CD4⁺ T cells.

Our work also allowed us to further explore the relationship between Tax ubiquitination and Tax SUMOylation. Indeed, as mentioned above, Tax-P79AQ81A mutant whose endogenous SUMOylation is reduced by around 80% is ubiquitinated at the same level as wt Tax, both in terms of total ubiquitination and specific conjugation to K63-linked ubiquitin chains. This strongly suggests that Tax SUMOylation is dispensable for Tax ubiquitination. That Tax SUMOylation may represent a signal for Tax ubiquitination was indeed recently proposed based on findings showing that RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin ligase (STUbL), was able to modulate Tax ubiquitination [27]. It was shown that RNF4 induced the ubiquitination of a SUMO-1 fused recombinant Tax

protein *in vitro* and that siRNA-mediated depletion of RNF4 abolished Tax ubiquitination. However, we found here that the SUMO-1 fused form of Tax was ubiquitinated at comparable level as non-fused Tax in HeLa cells. Moreover, we show that in contrast to RNF4 depletion, low Tax SUMOylation does not prevent Tax ubiquitination in cells. Of note, a GFP-tagged Tax was used in the RNF4 study [27] while our experiments were performed using a Tax-6his construct, which could lead to difference in Tax modifications and/or localization. In addition, it cannot be excluded that the low residual level of SUMOylation of Tax-P79AQ81A could be still sufficient to promote Tax ubiquitination. However, this would likely have been associated to a certain degree of reduction of Tax ubiquitination, as observed in RNF4-depleted cells [40]. Along with these findings, our data suggest therefore that RNF4 may not directly modulate wild-type Tax ubiquitination, but acts in an indirect manner by interfering with ubiquitination machineries or with direct regulators of Tax ubiquitination.

We previously concluded that ubiquitination and SUMOylation were both required for optimal NF- κ B activation by Tax through analysis of lysine mutants and SUMO-1-fused proteins. In this study, we revisited the role of Tax SUMOylation through a direct approach based on an ubiquitinated but intrinsically weakly SUMOylated Tax mutant. We found that Tax-P79AQ81A retains most of the NF- κ B activity of wt Tax, while in the same conditions, very little NF- κ B activity was measured for a mutant defective for both ubiquitination and SUMOylation (Tax-K4-8R). Potent NF- κ B activation by Tax-P79AQ81A was not only observed in 293 T cells and HeLa cells but also in T cells. Indeed, Tax-P79AQ81A is as active as wt Tax in CEM T cells and more importantly, in primary CD4⁺ T lymphocytes. Of note, study of another mutant, K7R, confirms that weak SUMOylation does not preclude NF- κ B activation. Finally, we were able to document that the abilities to activate a NF- κ B promoter of a series of Tax mutants correlate with their levels of ubiquitination but not of SUMOylation. It could be argued that low level of SUMOylation would be

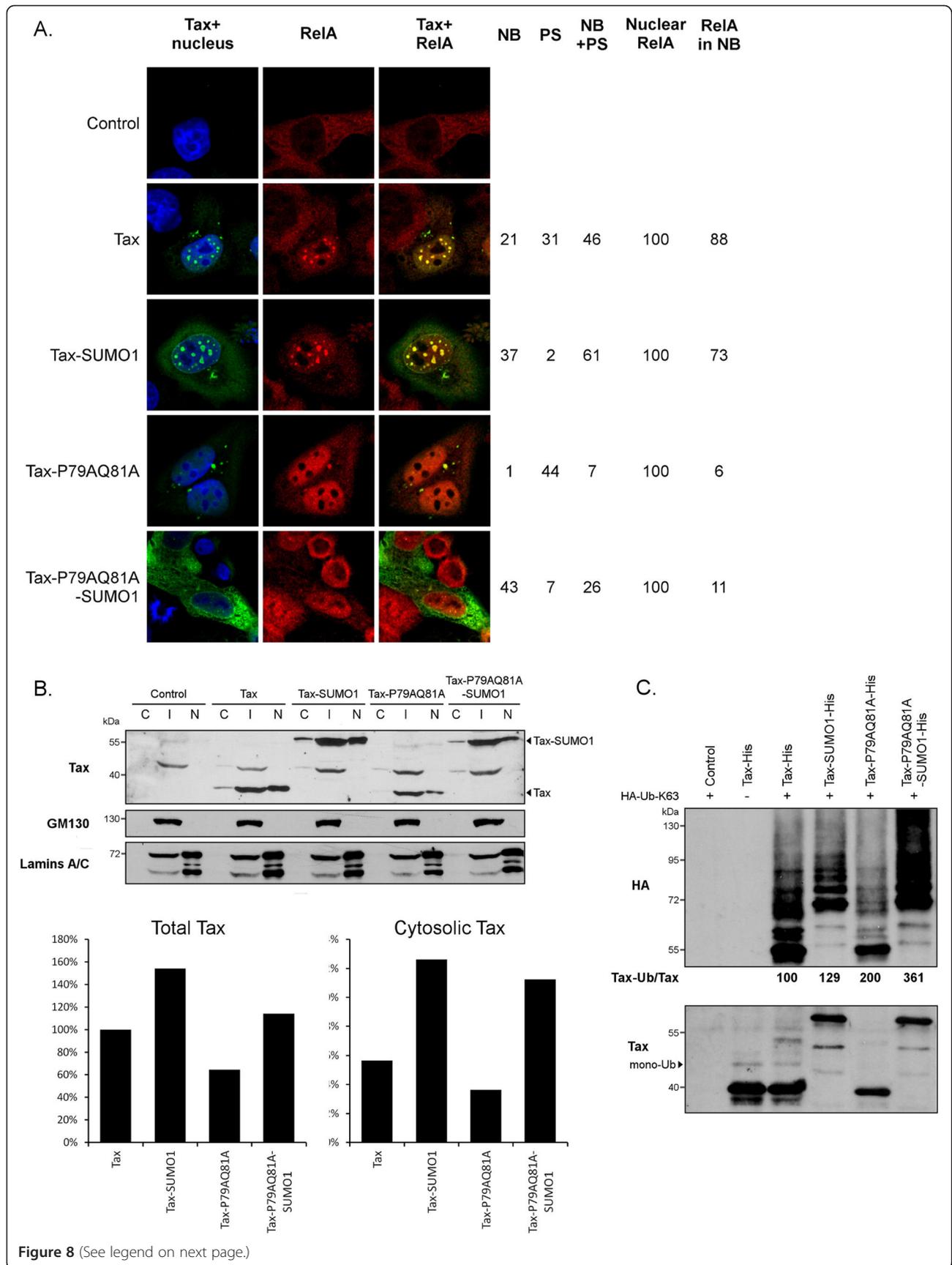


Figure 8 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 8 SUMO-1 fusion increases the cytosolic level and ubiquitination of Tax-P79AQ81A. (A) Confocal microscopy analysis showing the distribution of Tax or Tax-P79AQ81A fused or not to SUMO-1 (green) and of endogenous RelA (red) as well as nucleus staining (blue). The percentages of cells containing Tax in only nuclear bodies (NB), perinuclear spots (PS) or in both locations (NB + PS) are indicated. The percentages of cells containing RelA in the nucleus and the percentages of nuclear bodies-positive cells containing RelA in nuclear bodies are also indicated. At least 100 cells were analyzed in each condition. (B) Cell fractionation analysis. Cell extracts were separated in a cytosolic (C), intermediate (I) and nuclear (N) fraction as described [32]. Upper panel: Proteins were blotted with either an anti-Tax sera; anti-GM130, a marker of the intermediate fraction (Golgi apparatus), or anti-Lamins A/C, a marker of the nuclear fraction. Lower panel: the intensity of the Tax bands in all three fractions was quantified (Total Tax) and normalized to 100% for wt Tax. The proportion of Tax in the cytosolic fraction was calculated by dividing the intensity of each cytosolic Tax band by the value of Total Tax. (C) Ubiquitination of non-fused or fused wt Tax and Tax-P79AQ81A proteins. Ni-NTA experiments were performed in HeLa cells transfected with a control plasmid or the Tax-His constructs together with a HA-Ub-K63 plasmid. The percentages of HA-Ub-K63 conjugated products were normalized on the amount of unconjugated Tax and expressed in comparison to wt Tax (100%).

sufficient to regulate some Tax activities, even in absence of Tax nuclear bodies. However, our findings provide strong evidence that Tax SUMOylation is not a key determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

That low SUMOylation does not alter Tax-induced NF- κ B activation appears to contradict our previous findings showing that fusion of SUMO-1 to lysine mutants restored their NF- κ B activities. However, we believe that our current and earlier data can be reconciled in light of recent findings from other groups. Indeed, we and others previously noticed that the SUMO-1 fusion restores the NF- κ B activity of some but not all lysine Tax mutants: i.e., it restores the NF- κ B activities of Tax-K6-8R or Tax-K7-8R (also referred to as Tax-R4-6 K), which retains partial ubiquitination, but not that of Tax-K4-8R, which is no longer ubiquitinated [20,24]. Moreover, we documented that fusion of SUMO-1 does not increase the NF- κ B activity of either wt Tax [24] or Tax-P79AQ81A (data not shown), which are both fully ubiquitinated. Fusion of SUMO-1 appears, therefore, to only enhance the NF- κ B activity of partially but not fully ubiquitinated Tax proteins. As mentioned above, RNF4 was recently shown to induce the ubiquitination of a recombinant GFP-Tax protein fused to SUMO-1 *in vitro* [27]. Hence, artificial fusion of SUMO-1 to the Tax mutants may similarly enhance their ubiquitination by facilitating the interaction with RNF4. Strikingly, it was previously reported that fusion of SUMO-1 increases the endogenous ubiquitination of Tax-K7-8R/Tax-R4-6 K but not Tax-K4-8R [20]. Furthermore, we show here that fusion of SUMO-1 stabilizes both Tax and Tax-P79AQ81A in the cytosol but only significantly increases ubiquitination of Tax-P79AQ81A. This latter effect is reminiscent of the cytoplasmic relocation and enhanced ubiquitination of the GFP-tagged Tax construct upon RNF4 overexpression [27]. Why RNF4 would only increase the ubiquitination of Tax mutants but not wt Tax remains to be elucidated. Because these proteins differ by the presence or absence of SUMOylation, it could be speculated that the natural SUMO chains of Tax may somehow prevent the interaction of wt Tax or Tax-

SUMO-1 with RNF4. Whatever the exact mechanism involved, these findings support the view that the effect previously attributed to the fusion of SUMO-1 to lysine Tax mutants was actually linked to Tax stabilization and/or facilitation of Tax ubiquitination.

Conclusions

Our findings provide strong evidence that Tax SUMOylation and formation of Tax nuclear bodies are dispensable for proper NF- κ B pathway activation by Tax, especially in natural target cells of HTLV-1 infection. In contrast, preventing both ubiquitination and SUMOylation of Tax is detrimental for NF- κ B activation, highlighting the critical importance of the ubiquitin-dependent cytoplasmic events that involve the Tax/IKK interaction. Targeting ubiquitination pathways has emerged as a new promising therapeutic approach of malignancies [41]. Given the critical role that Tax-induced NF- κ B activation plays in HTLV-1-induced T cell transformation [5], such approach would be especially relevant in the treatment of HTLV-1-induced T-cell malignancies.

Methods

Cell culture and transfection

HeLa and 293 T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and antibiotics (Invitrogen) and were transfected using the lipofectamine reagent (Invitrogen). HTLV-1-infected T cells C8166 and HUT-102 as well as HTLV-1-negative CEM T cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented as above along with 0.5% glucose and were transfected using the DMRIE-C reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

Primary human CD4⁺ T cells were purified from peripheral blood samples of healthy donors from EFS (Etablissement Français du Sang, Paris). After separation of mononuclear cells by density gradient, CD4⁺ T cells were isolated by positive selection using CD4⁺ T lymphocyte enrichment immunomagnetic beads (Beckton Dickinson, France). Purified CD4⁺ T cells were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented as above and

containing 10% inactivated human serum (Sigma Aldrich) along with 50 IU/mL interleukin-2 (IL-2, PeproTech, France) and 3 mg of phytohemagglutinin-M (PHA-M, Sigma). CD4⁺ T cells were transfected using the Amaxa nucleofector (VPA-1002, Lonza) with the T23 program following the manufacturer's instructions.

Plasmids

All the Tax constructs used in this study encode proteins fused to a C-terminal 6His tag (His). Tax-His, lysine Tax mutants, Tax-M22-His and Tax-M47-His cloned in the pSG5M vector, HTLV-1-LTR-Luc, NF- κ B-Luc and pRL-TK plasmids were described elsewhere [24,32]. To generate the Tax-P79AQ81A mutant, a fragment comprised between the EcoRI and PmlI restriction sites of the Tax cDNA was mutated and amplified using the following primers: forward mutagenic Tax primer [5'CTCC-TTCGCGACCGCGAGAACCTCTAAG3'] and reverse mutagenic Tax primer [5'CTTAGAGTTCTCGCGGT-CGCGAAGGAG3'] as well as the cloning primers TaxEcoF [5'GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTC3'] and TaxPmlI [5'CACGTGGGGCAGGAGGGGC-CAGGTG3']. Two separated PCR reactions were first performed using either the forward mutagenic Tax primer and TaxPmlI or the reverse mutagenic Tax primer and TaxEcoF, and the two amplified fragments were mixed and used to perform a global PCR reaction using the TaxEcoF and TaxPmlI primers. The final PCR product was then cloned in the pTOPO vector (Invitrogen), and the EcoRI-PmlI fragment of pTOPO-Tax-P79AQ81A was finally introduced into the pSG5M vector. Correct introduction of the mutation was attested by the presence of a NruI site (introduced into the mutagenic primers). The Tax-P79AQ81A mutation was then introduced in the Tax-SUMO-1-6His plasmid by exchanging the EcoRI-PmlI fragments. The integrity of all constructs was verified by sequencing.

Antibodies

Tax was detected using a pool of sera from HTLV-1 infected individuals (anti-Tax sera) or the anti-Tax monoclonal antibody (mab) 168-A51 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA). The following primary antibodies were used: Ubiquitin (P4D1 from Tebu Bio or Fk2 from Millipore), Ub-K63 chains (D7A11; Cell Signaling Technology), SUMO 2/3 (ab3742; Abcam), HA-tag (12CA5; Roche), RelA/p65 (sc-372) and IKK γ (sc-8330) (Santa Cruz) phospho-IKK α/β (C84E11; Cell Signaling), GM-130 (610822, BD Biosciences) and Lamin A/C (2032, Cell signaling). HRP-conjugated anti-human, anti-mouse and anti-rabbit IgG (Promega) were used as secondary antibodies in western blot. The following secondary antibodies were used for immunostaining: goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 594 or Cyanine 5

(Invitrogen) and donkey anti-mouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Jackson ImmunoResearch).

Luciferase assays

Luciferase assays were performed in duplicates in 24-well plates for HeLa or 293 T cells (3×10^4 /well), CEM T cells (4×10^5 /well) or sorted CD4⁺ primary T cells (2.5×10^6 /well). CD4⁺ primary T cells were starved by removing PHA and IL-2 from the culture medium 24 h before transfection. HeLa, 293 T and CEM cells were cotransfected with 500 ng of either the NF- κ B-Luc or HTLV-1-LTR-Luc (CREB) reporter plasmid, 50 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK and 1 μ g of the control or the Tax plasmids. CD4⁺ primary T cells were cotransfected with 2 μ g of either the NF- κ B-Luc or HTLV-1-LTR-Luc reporter plasmid, 500 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK and 3 μ g of the control or the Tax plasmids. Luciferase activity was quantified 24 h post-transfection for 293 T cells or 48 h post-transfection for HeLa cells or T cells using the Dual Luciferase Assay System (Promega) and values were normalized with Renilla activity. Statistical analyses were performed using the student test.

Cell lysis, cell fractionation, immunoprecipitation and immunoblot

Preparations of cellular aggresome were performed as described in [37]. Cell fractionation in cytosolic, intermediate and nuclear fractions was performed as described in [32].

Immunoprecipitations were carried out as follow: at 24 h post-transfection, HeLa cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 150 mM NaCl) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cell lysates were incubated overnight with the anti-Tax mab at 4°C, and antibody complexes were captured on protein G-sepharose beads (GE Healthcare) 1 h at 4°C. Sepharose beads were then washed 5 times in wash buffer (120 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH8, 0.2 mM NaF, 0.2 mM EGTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% NP40) before elution in Laemmli buffer.

Proteins in cell fractions, immunoprecipitated proteins and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with specific antibodies. For quantification, shortly exposed films were scanned with an AGFA scanner, and signal densities of proteins were measured with ImageJ software (Wayne Rasband; NIH). Signal density in an empty lane was also measured and subtracted from the signal of each band.

Ni-NTA pull-down

At 24 h post-transfection, HeLa cells were lysed in reducing and highly denaturing conditions in buffer A (6M

Guanidium-HCl, 0.1M NaH₂PO₄, 10 mM imidazole, pH 8) and incubated with Ni²⁺-NTA (nitrilotriacetic acid) beads (Sigma) for 3 h at room temperature. The beads were washed three times in buffer A, twice in buffer B (buffer A diluted 1:4 in buffer C) and twice in buffer C (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM imidazole). The proteins bound were eluted in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and blotted with specific antibodies. Film quantification was performed as described above.

Confocal analysis

HeLa or 293 T cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates the day before transfection and staining was performed 24 h post-transfection. At 24 h post-transfection, transfected CEM T cells were washed once with PBS and deposited onto poly-L-lysine coated coverslips in RPMI 1640 medium for 1 h at 37°C. Both cell types were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed twice with PBS, permeabilized with cold methanol for 5 min, and washed twice with PBS. The cells were incubated in PBS containing 2% BSA and 0.1% Tween for 30 min and then with primary antibodies diluted in PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween for 1 h. After 3 washes with PBS containing 0.1% Tween, the cells were incubated with secondary antibodies diluted in PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween for 45 min. The cells were washed with PBS-Tween buffer, and incubated with DAPI (Sigma) diluted in PBS for 10 min for nucleus staining. After two washes with PBS, the coverslips were mounted in FluorSave Reagent (Calbiochem). Laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS resonant scanner multi-photon (spinning disc) with a 63X objective, and images were analyzed using ImageJ software.

Additional files

Additional file 1: Figure S1: Subcellular localization of wt Tax and Tax-P79AQ81A in the cells. Description of data. Confocal microscopy analysis performed in HeLa cells showing Tax localization (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). The percentages of cells containing Tax in only nuclear bodies (NB), in only perinuclear spots (PS) or in nuclear bodies + perinuclear spots (NB + PS) are indicated for both wt Tax and Tax-P79AQ81A. At least 200 cells were analyzed. NB and PS are indicated by arrows and arrow heads, respectively.

Additional file 2: Figure S2. CREB promoter activities of the Tax proteins used in the study. Description of data. (A-D) Comparison of the CREB promoter activities of wt Tax and Tax-P79AQ81A in Tax-transfected HeLa cells (A), 293 T cells (B), CEM T cells (C) and primary CD4⁺ T cells (D). Cells were transfected with a control plasmid or with the Tax-His constructs along with the CREB reporter plasmid and the Renilla luciferase expression plasmid for normalization. (E) CREB promoter activities of the lysine Tax mutants in 293T cells. In all experiments, the M22 (defective for the NF-κB pathway) and M47 (defective for the CREB pathway) mutants were included as controls. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the firefly/renilla ratio obtained with the control plasmid. The results

represent the means and standard error of the means (SEM) from at least four independent experiments performed in duplicates.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

A.Bo. designed and performed the work, analyzed the data and wrote the paper. V.R. performed experiments with primary cells, analyzed the data and edited the paper. P.N and M.N contributed to biochemical experiments and analyzed data. M.C., L.W. and S.P. contributed to molecular biology experiments. A.Ba. and R.M contributed reagents and ideas for the work and edited the paper. L.B. designed experiments and edited the paper. C.P designed and supervised the study and wrote the paper. All authors approved the submitted manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Anne-Lise Haenni, Florence Margottin-Goguet and Cecilia Ramirez for critical reading of the manuscript and members of the Cellular Imaging platform of the Cochin Institute for their help. We thank the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for the anti-Tax mab. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité de Paris), Institut National du cancer (InCA), Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA) and Fondation de France.

Author details

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France. ²CNRS, UMR8104, Paris, France. ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁴Department of Internal Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon. ⁵INSERM, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

Received: 3 March 2012 Accepted: 1 September 2012

Published: 25 September 2012

References

1. Journo C, Douceron E, Mahieux R: HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* 2009, **4**:425–440.
2. Taylor JM, Nicot C: HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 2008, **13**:733–747.
3. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L: The HTLV-1 tax interactome. *Retrovirology* 2008, **5**:76.
4. Peloponnes JM Jr, Kinjo T, Jeang KT: Human T-cell leukemia virus type 1 tax and cellular transformation. *Int J Hematol* 2007, **86**:101–106.
5. Robek MD, Ratner L: Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol* 1999, **73**:4856–4865.
6. Vallabhapurapu S, Karin M: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:693–733.
7. Harhaj EW, Sun SC: IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus tax protein. *J Biol Chem* 1999, **274**:22911–22914.
8. Shembade N, Ma A, Harhaj EW: Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 2010, **327**:1135–1139.
9. Journo C, Filipe J, About F, Chevalier SA, Afonso PV, Brady JN, Flynn D, Tangy F, Israel A, Vidalain PO, et al: NRP/Optineurin cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000521.
10. Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE, Harhaj EW: The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol* 2008, **9**:254–262.
11. Yu Q, Minoda Y, Yoshida R, Yoshida H, Iha H, Kobayashi T, Yoshimura A, Takaesu G: HTLV-1 tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **365**:189–194.
12. Sun SC, Yamaoka S: Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* 2005, **24**:5952–5964.

13. Petropoulos L, Lin R, Hiscott J: Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology* 1996, **225**:52–64.
14. Suzuki T, Hirai H, Yoshida M: Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* 1994, **9**:3099–3105.
15. Baydoun H, Duc-Dodon M, Lebrun S, Gazzolo L, Bex F: Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* 2007, **386**:191–201.
16. Bex F, McDowall A, Burny A, Gaynor R: The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol* 1997, **71**:3484–3497.
17. Semmes OJ, Jeang KT: Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol* 1996, **70**:6347–6357.
18. Fryrear KA, Durkin SS, Gupta SK, Tiedebohl JB, Semmes OJ: Dimerization and a novel Tax speckled structure localization signal are required for tax nuclear localization. *J Virol* 2009, **83**:5339–5352.
19. Kfoury Y, Setterblad N, El-Sabban M, Zamborlini A, Dassouki Z, El Hajj H, Hermine O, Pique C, de The H, Saib A, Bazarbachi A: Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 2011, **117**:190–199.
20. Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F: Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 2005, **25**:10391–10406.
21. Chin KT, Chun AC, Ching YP, Jeang KT, Jin DY: Human T-cell leukemia virus oncoprotein tax represses nuclear receptor-dependent transcription by targeting coactivator TAX1BP1. *Cancer Res* 2007, **67**:1072–1081.
22. Durkin SS, Guo X, Fryrear KA, Mihaylova VT, Gupta SK, Belgnaoui SM, Haoudi A, Kupfer GM, Semmes OJ: HTLV-1 tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2008, **283**:36311–36320.
23. Lodewick J, Lamsoul I, Bex F: Move or die: the fate of the tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* 2011, **3**:829–857.
24. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de The H, Pique C, Bazarbachi A: Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* 2006, **107**:4021–4029.
25. Peloponese JM Jr, Iha H, Yedavalli VR, Miyazato A, Li Y, Haller K, Benkirane M, Jeang KT: Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* 2004, **78**:11686–11695.
26. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C: Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol* 2004, **78**:11823–11832.
27. Fryrear KA, Guo X, Kerscher O, Semmes OJ: The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein tax. *Blood* 2012, **119**:1173–1178.
28. Lavorgna A, Harhaj EW: An RNA interference screen identifies the deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF-kappaB activation. *J Virol* 2012, **86**:3357–3369.
29. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT: Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF-kappaB signaling. *J Virol* 2011, **85**:6212–6219.
30. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW: The human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol* 2007, **81**:13735–13742.
31. Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J: Activation of the I kappa B kinase complex by HTLV-1 tax requires cytosolic factors involved in tax-induced polyubiquitination. *J Biochem* 2011, **150**:679–686.
32. Kfoury Y, Nasr R, Favre-Bonvin A, El-Sabban M, Renault N, Giron ML, Setterblad N, Hajj HE, Chiari E, Mikati AG, *et al*: Ubiquitylated tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 2008, **27**:1665–1676.
33. Harhaj NS, Sun SC, Harhaj EW: Activation of NF-kappa B by the human T cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein is associated with ubiquitin-dependent relocalization of I kappa B kinase. *J Biol Chem* 2007, **282**:4185–4192.
34. Gatz ML, Dayaram T, Marriott SJ: Ubiquitination of HTLV-1 tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* 2007, **4**:95.
35. Au PY, Yeh WC: Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* 2007, **597**:32–47.
36. Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H: The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* 1999, **4**:321–330.
37. Garcia-Mata R, Bebek Z, Sorscher EJ, Sztul ES: Characterization and dynamics of aggregates formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 1999, **146**:1239–1254.
38. Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D: HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. *Virology* 1993, **196**:15–24.
39. Poesz 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 USA* 1980, **77**:7415–7419.
40. Wang YT, Yang WB, Chang WC, Hung JJ: Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol* 2011, **414**:1–14.
41. Sun Y: Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003, **2**:623–629.

doi:10.1186/1742-4690-9-77

Cite this article as: Bonnet *et al*: Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* 2012 **9**:77.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

