



Numéro National de Thèse : 2017LYSEN027

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité : Virologie

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 13/07/2017, par :

Aurélien SCHWOB

Rôle des récepteurs de l'autophagie sélective dans la modulation de la signalisation NF- κ B par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1

Devant le jury composé de :

Dr Lucile ESPERT	Chargée de Recherche au CNRS	Rapportrice
Dr Claudine PIQUE	Directrice de Recherche au CNRS	Rapportrice
Dr Philippe AFONSO	Chercheur à l'Institut Pasteur	Examinateur
Dr Evelyne MANET	Directrice de Recherche au CNRS	Examinatrice
Pr Patrice GOUET	Professeur à l'Université de Lyon	Examinateur
Pr Renaud MAHIEUX	Professeur à l'ENS de Lyon	Examinateur invité
Dr Chloé JOURNO	Maître de Conférences à l'ENS de Lyon	Directrice de thèse

RÉSUMÉ

Rôle des récepteurs de l'autophagie sélective dans la modulation de la signalisation NF- κ B par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1

L'activation constitutive de la voie NF- κ B est une étape cruciale dans le processus de transformation des lymphocytes T par le virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1). La protéine virale Tax y joue un rôle majeur en recrutant la protéine régulatrice IKK γ . De précédents travaux effectués par notre équipe ont montré que l'activation de la voie NF- κ B par Tax est promue par le recrutement des facteurs cellulaires Optineurine (OPTN) et Tax1-binding protein 1 (TAX1BP1), deux protéines récemment décrites comme des membres de la famille de récepteurs autophagiques Sequestosome-Like Receptors (SLR), posant la question des liens fonctionnels entre la signalisation NF- κ B et la machinerie autophagique.

Notre étude décrit l'interaction de Tax avec le récepteur p62, autre membre de la famille des SLR. L'interaction est directe et indépendante de l'ubiquitination de Tax. Les facteurs Tax, p62 et IKK γ forment des complexes localisés au niveau de membranes autophagiques. Le facteur p62 promeut spécifiquement l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Étonnamment, la sur-expression de p62 limite la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B, en induisant la déplétion cytosolique de Tax. Ces résultats indiquent que p62 peut exercer des effets antagonistes sur Tax selon son taux d'expression. Des données préliminaires suggèrent que Tax lie également d'autres membres de la famille des SLR, avec des conséquences variables sur l'activation de la voie NF- κ B.

Ce travail apporte des connaissances nouvelles concernant les relations entre Tax, la signalisation NF- κ B et la machinerie autophagique, suggérant l'utilisation des membranes autophagiques comme plateformes de signalisation virale.

Mots clés : HTLV-1, Tax, Oncogénèse virale, Autophagie, p62, Signalisation, NF- κ B, Plateformes de signalisation.

ABSTRACT

Involvement of selective autophagy receptors in the modulation of NF- κ B signaling by the HTLV-1 Tax oncoprotein

NF- κ B constitutive activation is a key step in the HTLV-1-mediated T lymphocytes transformation process. This activation is mainly driven by the viral protein Tax, which recruits the IKK γ regulator factor. Previous work performed in our lab showed that Tax-induced NF- κ B activation is promoted by the interaction with several cellular factors such as Optineurin (OPTN) and Tax1-binding protein 1 (TAX1BP1), two members of the Sequestosome-Like Receptors (SLR) family, rising the hypothesis of functional interplay between NF- κ B signaling and the autophagic pathway.

Our study demonstrates that Tax interacts with the p62 receptor, which is another SLR member, in a direct, ubiquitin-independent manner. Tax and p62 form complexes located at autophagic membranes, together with IKK γ . P62 potentiates the Tax-mediated NF- κ B activation. Unexpectedly, p62 over-expression inhibits Tax-mediated NF- κ B activation by inducing Tax cytoplasmic depletion. These results show that p62 plays a dual role on Tax in a dose-dependent manner. Preliminary data suggest that Tax is also able to interact with other SLR, with various consequences on activation of the NF- κ B pathway.

This work contributes to the further characterization of the complex interplay between Tax, NF- κ B signaling and the autophagic pathway, suggesting the use of autophagic membranes as viral signaling platforms.

Keywords : HTLV-1, Tax, Viral oncogenesis, Autophagy, p62, Signaling, NF- κ B, Signaling platforms.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail. Un remerciement particulier va aux deux rapportrices de cette thèse, les Dr. Claudine Pique et Lucile Espert pour leurs commentaires et discussions qui m'ont aidé à améliorer la qualité du présent manuscrit. Un grand merci à Chloé Journo pour le suivi de la rédaction du manuscrit, ainsi qu'à Hélène Dutartre et Pauline Verlhac pour leurs relectures.

Ces quatre dernières années passées au laboratoire n'auraient pas eu lieu sans Renaud Mahieux et Chloé Journo, qui ont accepté de m'accueillir dans l'équipe tout en me laissant la possibilité de changer de direction en fonction des résultats de l'agrégation. Ce risque n'était pas anodin et je vous remercie du fond du cœur pour la confiance que vous m'avez accordée. À une époque où la notion de gratitude est parfois perçue comme surannée, et au milieu de cette forêt de remerciements, mon vocabulaire s'avère impuissant à exprimer avec la force nécessaire le *Merci* le plus important de cette section : celui que j'adresse à Chloé Journo pour m'avoir ouvert la voie, suivi, orienté, épaulé avec pédagogie, supporté avec patience, inlassablement remis en selle, pour m'avoir passé mes innombrables sautes d'humeurs, mes accès de rage, mon nihilisme, mon pessimisme et ma mauvaise humeur au cour de ces quatre années. Merci aussi pour tout ce que tu m'as apporté en-dehors de la recherche, que ce soit en enseignement ou lors de discussions plus ludiques. Sans ce soutien, je ne serai probablement pas en train d'écrire ces lignes. Un grand merci également à Renaud Mahieux, dont la supervision a été très enrichissante. Merci aussi pour toutes ces discussions scientifiques, pédagogiques et diverses, qui m'ont beaucoup manqué au cours de ces derniers mois.

Merci à tous les membres de l'équipe OR, passés et présents, qui ont fait partie de ma vie au cours de ces années. Merci à Hélène Dutartre pour nos discussions et pour son soutien, à Jocelyn Turpin et Anne Cachat pour ce qu'ils m'ont apporté scientifiquement avant de partir

vers d'autres horizons. Merci à Gergès, Nicolas, Élodie et Brice, mes camarades thésards, pour ces instants partagés, qu'ils soient scientifiques ou non. Merci également à Sandrine, Louise, Amandine, Justine, Florence et Victoria. Bravo à Janelle et Marie qui ont supporté ma tyrannique supervision. Merci à nos voisins de laboratoire, compagnons de bureau et de machine à café pour avoir fait partie intégrante de cette aventure.

J'ai une pensée pour toutes les autres personnes formidables qui ont participé à ma formation scientifique. À Stéphanie, Stéphanie et Xuan-Nhi pour m'avoir accompagné lors de mes premiers pas, à l'équipe de Xavier Roucou, notamment à Guillaume Tremblay et Benoît Vanderperre pour m'avoir accueilli et formé sans rien attendre en retour. Merci enfin à Dimitri Lavillette et à sa petite équipe, à Sarah, Sarah, Dimitri et Florian. Je garderai toujours un souvenir tendre de notre petite compagnie, soudée dans l'adversité.

C'est ma passion pour la biologie qui m'a conduite à l'ENS, et j'aimerais avoir un mot pour tous ceux qui ont fait de ces années une période faste d'épanouissement intellectuel et scientifique. Merci, entre autre, à Renaud Mahieux, Chloé Journo, Mathias Faure, Chantal Rabourdin-Combe, Déborah Prévôt, Jean-Pierre Moussus, David Busti, Laurent Balvay, Antoine Corbin, Fabien Mongelard, Vincent Laudet et Jean-Nicolas Volff pour leurs enseignements passionnants et épanouissant. Une pensée également aux autres enseignants dont j'ai eu la chance de croiser la route et qui ont su me transmettre leur passion, MM. Moyaux, Zurbach, Netter, Luthringer, Thépaut et Ebersold, ainsi que M^{mes} Dumel et Gueth.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont entouré ces dernières années et qui se reconnaîtront de manière plus ou moins explicite. Le groupe des taroteurs : Flo, Cath, Beno et tovarich Alex ; mon Despote dont je resterai à jamais le Disciple, une bactérie blonde ; les (ex-)Lyonnais Loïc, Julien et Sam ; les L3 2009 et les agreg 2013, Damien, Léo, Bernard et les rôlistes, Lambin et les nanardeurs, Madame l'ex Directrice Adjointe aux Études, ainsi que mes camarades moniteurs. Un immense merci à celles qui ont été présentes au quotidien : Pauline pour ton omniprésence dans mes activités personnelles et scientifiques, Mathilde pour ta bonne humeur et ta gestion de l'espace, Éléonore pour... tout ! Une pensée reconnaissante également au centre de mon univers : mes *vieux*, pour leur soutien et la sérénité qu'ils m'apportent depuis toutes ces années, Alexia dont la force est un exemple pour moi et à qui je souhaite le meilleur, ainsi que Raphaëlle pour qui les mots ne suffisent littéralement pas. Mon ultime pensée bienveillante va à ceux qui ne liront jamais ces lignes car ils ne sont plus là pour le faire. Mon ultime pensée tout court va à ceux qui n'auraient jamais imaginé que je les écrive un jour et dont le mépris alimente sans cesse ma motivation.

Table des matières

Abréviations	13
1 Introduction	15
I HTLV-1 : un virus oncogène	17
A. Historique de la découverte des virus oncogènes animaux	17
B. Vers le recensement des virus oncogènes humains	18
C. Modalités moléculaires de l'oncogenèse virale	23
D. La question de la causalité des virus oncogènes	25
II Épidémiologie et biologie cellulaire de l'infection HTLV-1	27
A. Épidémiologie de l'infection par HTLV-1	27
B. Cycle viral d'HTLV-1	29
C. La réponse immunitaire envers HTLV-1	37
D. Pathogenèse ATL liée à HTLV-1	43
III Rôle de Tax dans la transformation cellulaire	45
A. Tax, le couteau suisse de HTLV-1	45
B. L'induction multi-latérale de la transformation cellulaire médiée par Tax	50
C. Après les étapes précoces de la transformation cellulaire : quel rôle pour Tax ?	61
IV Induction de la voie NF- κ B par Tax	66
A. Rôle biologique et fonctionnement de la voie NF- κ B	66
B. L'induction de la voie NF- κ B par Tax	76

V	Autophagie, récepteurs autophagiques et voie NF- κ B	85
A.	L'autophagie sélective : modalités et rôles biologiques	85
B.	Relations entre l'autophagie et la signalisation NF- κ B	104
C.	Relations entre les SLR et la voie NF- κ B en contexte non-infectieux . . .	106
VI	Problématique du travail de thèse	109
2	Résultats	111
I	Interaction Tax / p62	113
A.	Mise en évidence d'une interaction entre Tax et p62	113
B.	Caractérisation de l'interaction entre Tax et p62	115
C.	Localisation sub-cellulaire des complexes Tax / p62	120
II	Potentialisation par p62 de l'action de Tax sur NF- κ B	127
A.	Les complexes Tax / p62 et le facteur IKK γ	127
B.	Effet de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax	130
C.	Bilan : Importance de l'autophagie sélective dans la potentialisation, par p62, de l'activation de NF- κ B par Tax	137
III	Déplétion de Tax en sur-expression de p62	138
A.	Conséquences de la sur-expression de p62 sur Tax	138
B.	Caractérisation de la déplétion de Tax en sur-expression de p62	139
C.	Effets de l'activation de l'autophagie sur Tax	148
D.	Bilan : effet dual de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax	151
IV	Étude des autres membres de la famille SLR	152
A.	Implication de l'autophagie dans la potentialisation par OPTN de l'acti- vation de NF- κ B médiée par Tax	152
B.	Étude préliminaire de l'interaction entre Tax, NDP52 et NBR1	154
C.	Étude préliminaire des interactions fonctionnelles entre NDP52, NBR1 et l'activation de NF- κ B médiée par Tax	157
3	Discussion	159
I	Potentialisation par p62 de l'effet de Tax sur NF- κ B	162
A.	Régulation de la localisation du signalosome Tax / IKK γ au niveau des membranes autophagiques	162
B.	Modèle fonctionnel de la potentialisation par p62 de l'induction de la voie NF- κ B médiée par Tax	166

TABLE DES MATIÈRES

C.	Rôle de la dégradation autophagique dans l'activation de NF- κ B par Tax	168
D.	Rôle de l'ubiquitination de Tax	169
E.	Validation de la pertinence physiologique de la potentialisation par p62 .	169
II	Déplétion de Tax	171
A.	Pertinence physiologique de la sur-expression de p62	173
III	Généralisation des interactions Tax / SLR	174
A.	Interactions entre Tax et OPTN	174
B.	Premiers éléments sur les autres membres de la famille	175
4	Conclusion	177
	Références	181
	Annexes	215

Table des figures

1.1	Structure de la particule virale du HTLV-1	20
1.2	Virus oncogènes humains	22
1.3	Mécanismes d'oncogenèse par les rétrovirus aigus et cis-activateurs	24
1.4	Prévalence du virus HTLV-1 à l'échelle du globe	28
1.5	Génome du provirus HTLV-1	32
1.6	Régulation de l'expression du génome proviral	34
1.7	Transmission cellule-cellule du virus HTLV-1	36
1.8	Importance de l'immunité dans le devenir clinique de l'infection par HTLV-1	42
1.9	Principaux domaines fonctionnels de Tax-1	45
1.10	Effets transactivateurs de Tax sur le génome proviral	49
1.11	Effets de Tax sur le cycle cellulaire	52
1.12	Effets de Tax sur la promotion de l'aneuploïdie	56
1.13	Effets de Tax sur les voies de réparation aux dommages à l'ADN	59
1.14	Effets du transcrit <i>hbz</i> et de la protéine HBZ sur la prolifération cel- lulaire	62
1.15	Modèle des rôles complémentaires de Tax et HBZ dans la transforma- tion cellulaire	66
1.16	Voie de recrutement du complexe IKK après engagement du TCR	70

TABLE DES FIGURES

1.17	Activation de la voie NF- κ B par le complexe régulateur IKK dans la signalisation TCR	73
1.18	Autres voies d'induction de NF- κ B	75
1.19	Recrutement du complexe IKK par Tax et partenaires cellulaires régulant ce recrutement	82
1.20	Vue d'ensemble des étapes du processus autophagique et de ses systèmes de conjugaison	90
1.21	La famille des Sequestosome-Like Receptors	96
1.22	Bases moléculaires de la sélectivité autophagique	99
1.23	Effets de Tax sur le flux autophagique	103
1.24	Interactions fonctionnelles entre la voie NF- κ B et l'autophagie cellulaire	106
1.25	Régulation de l'activation de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T par p62	108
2.1	Tax et p62 interagissent en cellules HeLa ainsi qu'en lignées chroniquement infectées par HTLV-1	114
2.2	L'interaction entre Tax et p62 est indépendante de l'ubiquitination de Tax et du domaine PBM	117
2.3	P62 interagit avec Tax de manière directe par son domaine MIR <i>in vitro</i>	119
2.4	Tax et p62 forment des complexes péri-nucléaires	121
2.5	Les complexes Tax / p62 sont localisés dans une zone péri-golgienne .	123
2.6	Les complexes Tax / p62 sont localisés au niveau de structures autophagiques riches en LC3	124
2.7	Les structures autophagiques auxquelles sont situés les complexes Tax / p62 semblent non-dégradatives	126
2.8	Le facteur IKK γ colocalise avec les complexes Tax / p62	128
2.9	Le facteur IKK γ est associé aux complexes Tax / p62	130
2.10	P62 porte un effet potentiateur sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax	132
2.11	P62 n'a pas d'effet sur le niveau d'ubiquitination de Tax	134

2.12	L'autophagie est impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax	136
2.13	Modèle proposé pour la potentialisation par p62 de l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B	137
2.14	La sur-expression de p62 porte un effet inhibiteur sur l'activation de NF- κ B par Tax	139
2.15	Tax est recruté par p62 en sur-expression de p62	140
2.16	Tax est déplété en condition de sur-expression de p62	141
2.17	La déplétion de Tax en condition de sur-expression de p62 est principalement cytosolique	143
2.18	L'inhibition de la dégradation lysosomale restaure la détection de Tax en sur-expression de p62	145
2.19	L'inhibition génétique de la machinerie autophagique est sans effet sur la déplétion de Tax sous effet de p62	147
2.20	Tax colocalise fortement avec p62 en condition d'activation de l'autophagie	149
2.21	Tax est déplété en condition d'activation de l'autophagie	150
2.22	Modèle proposé pour l'effet dual de p62 sur Tax	151
2.23	Des complexes Tax / OPTN localisent au niveau de structures autophagiques riches en LC3	153
2.24	L'autophagie est impliquée dans la potentialisation par OPTN de l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax	154
2.25	Tax interagit avec NBR1	155
2.26	Tax interagit avec NDP52	157
2.27	NBR1 et NDP52 portent des effets fonctionnels sur l'activation de NF- κ B médiée par Tax	158
3.1	Hypothèses de recrutement du signalosome Tax / IKK γ aux membranes autophagiques	165
3.2	Modèle de la potentialisation de la voie NF- κ B par p62 au niveau des membranes autophagiques	167

NB : Les publications individuelles ayant servi de base graphique aux figures sont indiquées dans les légendes. Les références ayant subi une reproduction partielle sont citées comme des

TABLE DES FIGURES

inspirations, celles dont la reproduction partielle s'accompagne de reprise directe d'éléments d'illustration comme des *adaptations*.

Certaines lectures ayant eu, au cours de ces dernières années, un impact global sur le style graphique et les usages de représentation utilisés ne sont pas citées. Il s'agit principalement des thèses de doctorat des Dr. Chloé Journo et Pauline Verlhac, ainsi que de diverses revues concernant l'autophagie publiées ces dernières années, notamment celles du Dr. Verlhac.

Abréviations

HTLV = Human T-Lymphotropic Virus	GLUT-1 = Glucose Transporter-1
ADAR = Adenosine Deaminase Acting on RNA	GST = Glutathione S-Transferase
Alfy = Autophagy-linked FYVE	HAM/TSP = HTLV- Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis
ALV = Avian Leukosis Virus	HBV = Hepatitis B Virus
AMBRA1 = Activating Molecule In BECN1- Regulated Autophagy Protein 1	HBZ = HTLV Basic leucine Zipper
AMPK = AMP-activated Protein Kinase	HCV = Hepatitis C Virus
AP1 = Activator Protein 1	HIV = Human Immunodeficiency Virus
APC = Anaphase Promotinf Factor	Hsp90 = Heat Shock Protein 90 kDa
ATG = Autophagy related	HSPG = Héparanes Sulfates Protéo Glycanes
ATL = Adult T Leukemia	ICAM = IntraCellular Interaction Molecule
ATM = Ataxia Telangectasia Mutated	IFN-I = InterFeroN de type 1
Bcl-2 = B-cell lymphoma-2	IKK = I κ B Kinase
BECN1 = Beclin protein	IRAK = Interleukin-1 Receptor-Associated Ki- nase
BER = Base Excision Repair	IRF = Interferon Regulatory Factor 4
CADM1 = Cell Adhesion Molecule 1	ISG = Interferon Stimulated Genes
CALCOCO = CALcium-binding and COiled-COil domain-containing protein	JSRV = Jaagsiekte Sheep RetroVirus
CBP = CREB Binding Protein	KIR = Keap-1 Interacting Region
CDK = Cyclin-Dependent Kinase	KSHV = Kaposi Sarcoma-associated Herpes Vi- rus
CHK = Checkpoint	LC3 = Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
CKI = CDK-Inhibitors	LFA1 = Lymphocyte Function-associated Antigen
CPA = Cellule Présentatrice de l'Antigène	LIR = LC3-Interacting Region
CRE = CREB Responsive Element	LUBAC = Linear Ubiquitin Chain Assembly Com- plex
CTL = Cytotoxic T Lymphocyte	MAM = Mitochondria-Associated-Membranes
CYLD = Cyldromatosis	MCL-1 = Myeloid Cell Leukemia 1
DSB = Double Strand Break	MEF = Mouse Embryo Fibroblast cells
EBV = Epstein-Barr Virus	MEK = MAPK/ERK Kinase
ERGIC = Endoplasmic Reticulum-Golgi Interme- diate Compartment	MIR = Multiple Interaction Region
FIP = FAK family kinase-Interacting Protein	MyD88 = Myeloid Differentiation primary res-
FYCO1 = FYVE and COiled-coil containing do- main 1)	

TABLE DES FIGURES

ponse gene 88	SKICH = Skeletal muscle and Kidney-enriched
NBR1 = Neighbor of BRCA 1 gene	Inositol phosphatase Carboxyl Homology
NDP52 = Nuclear Dots Protein 52 kDa	SLR = Sequestosome1-Like Family
NEMO = NF- κ B Essential Modulator	SNAP = Soluble NSF Attachment Protein
NER = Nucleotide Excision Repair	SNARE = SNAP REceptor
NES = Nuclear Export Sequence	SOCS = Suppressor Of Cytokine Signaling 1
NF- κ B = Nuclear Factor κ B	STAT = Signal Transducer and Activator of
NFAT = Nuclear Factor of Activated T-cells	Transcription
NHEJ = Non-Homologous End Joining	STING = STimulator of INterferon Genes
NIK = NF- κ B Inducing Kinase	SUMO = Small Ubiquitin-like MOdifier
NLS = Nuclear Localization Sequence	SWI/SNF = Switch/Sucrose Non Fermentable
NOG = NOD/Shi-scid/IL-2R γ^{null}	TAB = TAK1 Binding Protein
OPTN/NRP = Optineurin / NEMO-Related Pro- tein	TAK1 = TGF- β -Activating Kinase 1
PAMP = Pathogen-Associated Molecular Pattern	TBK1 = TANK-Binding Kinase 1
PBM = PDZ-Binding Motif	TBP = TATA-Binding Protein
pCAF = p300/CBP-Associated Factor	TCR = T-Cell Receptor
PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen	TIR = Toll-Interleukin Receptor
pDC = Plasmacytoid Dendritic Cell	TNF α = Tumor Necrosis Factor α
PDZ = Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)	TORC = Target Of Rapamycin Complex
PI3K = PhosphoInositide 3-Kinase	TRADD = TNFR-Associated Death Domain
PKC = Protein Kinase C	TRAF = TNF Receptor Associated Factor
PKR = Protein Kinase R	TRIF = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
PML = ProMyelocytic Leukemia protein	TRIM21 = TRIpartite Motif-containing protein 21
POLKADOTS = Punctate and Oligomeric Killing or Activating DOmains Transducing Signals	UBAN = Ubiquitin Binding in ABIN and NEMO
PRR = Pattern-Recognition Receptors	ULK = Unc Like Kinase
RIP-1 = Receptor Interacting Protein 1	UVRAG = UV Radiation resistance Associated Gene Protein
RNF = RiNg Finger Protein	VAMP = Vesicle-Associated Membrane Protein
ROS = Reactive Oxygen Species	VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule
RSV = Rous Sarcoma Virus	VPS34/PI3KC3 = Vacuolar Protein Sorting / PhosphoInositide-3-Kinase Complex III
RVFV = Rift Valley Fever Virus	
SINV = Sindbis Virus	

CHAPITRE 1

Introduction

I Le Virus Humain T-Lymphotrope de type 1 : un virus oncogène

A. Historique de la découverte des virus oncogènes animaux

A.1. Le sarcome de Rous, premier cas décrit de tumeur viro-induite

L'histoire de l'oncogenèse virale débute à l'aube du XX^e siècle, et ses prémisses côtoient donc ceux de la virologie en général. En effet, la démonstration de l'existence d'une entité ultra-filtrable, capable de se répliquer dans un organisme-hôte et invisible en microscopie optique n'a été formellement établie qu'en 1898 par le néerlandais Martinus Beijerinck. L'idée d'une potentielle origine virale de certains cancers apparaît moins d'une décennie plus tard, les premières observations de transmission de leucémie aviaire étant faites dès 1908 en Allemagne par Ellermann et Bang.

En 1911, le chercheur américain Peyton Rous met en évidence la transmission expérimentale de tumeurs très agressives chez le poulet. L'injection de filtrat acellulaire obtenu par broyage des tumeurs suivi d'une centrifugation et d'un passage en filtre Berkefeld, suffit à induire l'apparition de tumeurs au site d'injection chez les volailles saines [Rous, 1911]. Cette expérience est la première à montrer l'existence d'un agent acellulaire capable d'induire un développement tumoral. Cet agent est un rétrovirus, le virus du sarcome de Rous (RSV) et sera caractérisé bien plus tardivement.

A.2. Accélération des découvertes à partir des années 30

À partir de cette première description, de nombreux cancers d'origine virale vont être découverts chez les animaux. Dans les années 30, on décrit notamment le virus *Cottontail*, un virus de la famille des *Papillomaviridae* responsable de l'apparition d'impressionnantes tumeurs verruqueuses chez le lapin américain à queue blanche. La transmission de ces tumeurs est possible par inoculation d'extraits de broyats passés en filtres Berkefeld. L'inactivation à la chaleur ainsi que la neutralisation par le serum de lapins infectés sont observées et de nombreuses tentatives d'identification d'agents bactériens sont effectuées sans succès : l'hypothèse virale est maintenant directement évoquée et testée [Shope and Hurst, 1933].

B. Vers le recensement des virus oncogènes humains

B.1. Les virus d'Epstein-Barr et de l'hépatite B

L'inventaire grandissant des virus oncogènes animaux pose naturellement la question de l'existence de ces virus chez l'Homme. Vers la fin des années 50, Denis Burkitt, jeune médecin britannique décrit en Afrique centrale une pathologie caractérisée par le développement de tumeurs très agressives, se développant fréquemment au niveau de la mâchoire de jeunes enfants. La distribution géographique de ce qui est connu aujourd'hui sous le nom de "*Lymphome de Burkitt*" a rapidement suggéré une origine infectieuse, et l'association avec un virus a été évoquée dès 1962 [Burkitt, 1962].

Après quelques années de recherches, Anthony Epstein et Yvonne Barr détectent, par microscopie électronique, des particules virales dans une lignée cellulaire établie à partir de lymphome de Burkitt [Epstein et al., 1964]. Ces particules présentent une forte ressemblance structurale avec les virus de l'herpès. La caractérisation qui suivra montrera effectivement que ce virus, appelé virus d'Epstein-Barr (EBV, pour *Epstein-Barr Virus*) est un membre des *Herpesviridae*, capable d'infecter les lymphocytes B.

Cette découverte est suivie de près par l'identification d'un antigène viral retrouvé chez des patients atteints d'hépatocarcinome, et qui aboutira à la découverte du virus de l'hépatite B (HBV, pour *Hepatitis B Virus*), virus oncogène de la famille des *Hepadnaviridae* [Blumberg et al., 1967].

B.2. La découverte de HTLV-1, agent causal de la leucémie T de l'adulte

a) La leucémie T de l'adulte La leucémie T de l'adulte (ATL, pour *Adult T-cell Leukemia*) est caractérisée par la prolifération agressive de lymphocytes T CD4⁺ s'accompagnant de diverses complications cliniques parmi lesquelles on compte des cas de lymphadénopathies, de spléno- et hépato-mégalies ainsi que de fréquentes lésions cutanées. Le phénotype cellulaire des lymphocytes ATL est caractérisé par un noyau plurilobé, qui a inspiré le nom de *cellules en fleurs* [Uchiyama et al., 1977].

Notons également que l'infection par le virus HTLV-1 est également en cause dans un spectre de pathologies inflammatoires, incluant la Myélopathie Associée à HTLV et la Paraparésie Spastique Tropicale, regroupées sous le terme HAM/TSP (pour *HTLV-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis*), ainsi que des uvéites, dermatites infectieuses et des inflammations articulaires. Nous reviendrons sur la HAM/TSP ultérieurement.

b) Caractérisation du virus HTLV-1 C'est dans le cadre de l'ATL que le virus HTLV-1 a été découvert. La première étape a été la détection d'une activité de transcriptase inverse dans des cellules tumorales de patients ATL [Sarngadharan et al., 1972]. Des rétrovirus ont ensuite été identifiés à partir de différentes lignées issues de patients ATL, comme les lignées Hut102 et MT-2 [Poiesz et al., 1980, Yoshida et al., 1982]. Ces particules identifiées ont été classées dans les rétrovirus de type C (particule enveloppée à capsid centrale et à spicules glycoprotéiques courtes), et selon la classification actuelle, HTLV-1 est membre du genre δ rétrovirus (Figure 1.1). Ce fut le premier virus de la sous-famille des Orthoretrovirinae identifié chez l'Homme, le premier membre humain de la famille des *Retroviridae* identifié étant un spumavirus détecté dès 1971 [Achong et al., 1971].

Une intégration monoclonale du virus a ensuite été décrite dans les tumeurs primaires, suggérant fortement un lien de causalité entre le HTLV-1 et l'ATL [Yoshida et al., 1984]. L'ATL concerne environ 5 % des personnes infectées, et se développe la plupart du temps après une phase asymptomatique pouvant durer une cinquantaine d'années. La plupart des patients étant infectés nourrissons, l'ATL se développe généralement chez les adultes après l'âge de 50 ans.

c) Découverte des virus apparentés à HTLV-1 Assez rapidement, des virus apparentés à HTLV-1 ont été découverts, à la fois chez l'Homme mais aussi chez certains singes. Ces virus HTLV et STLV (pour *Simian T Lymphotropic Virus*) sont regroupés sous le terme PTLV (pour *Primate T-Lymphotropic Virus*).

Le premier autre PTLV identifié est le virus HTLV-2 [Kalyanaraman et al., 1982]. HTLV-2 présente une grande proximité avec HTLV-1, avec une organisation génomique similaire et environ 70 % de similarité génétique [Shaw et al., 1984]. HTLV-2 circule principalement dans des foyers endémiques en Afrique de l'Ouest, ainsi que dans des populations de toxicomanes en Amérique du Nord. Malgré l'identification initiale de ce virus dans des lymphocytes T leucémiques, le virus semble n'avoir de lien avec aucune pathologie cancéreuse. La seule manifestation pathologique liée à HTLV-2 est une lymphocytose persistante observée chez 20 à 30 % des personnes infectées [Bartman et al., 2008].

Plus récemment, les groupes PTLV-3 et 4 ont été mis au jour [Mahieux and Gessain, 2011]. Le premier PTLV-3 identifié était une forme simienne (STLV-3) isolée chez le babouin [Goubau et al., 1994]. La forme humaine correspondante (HTLV-3) a été découverte dans une com-

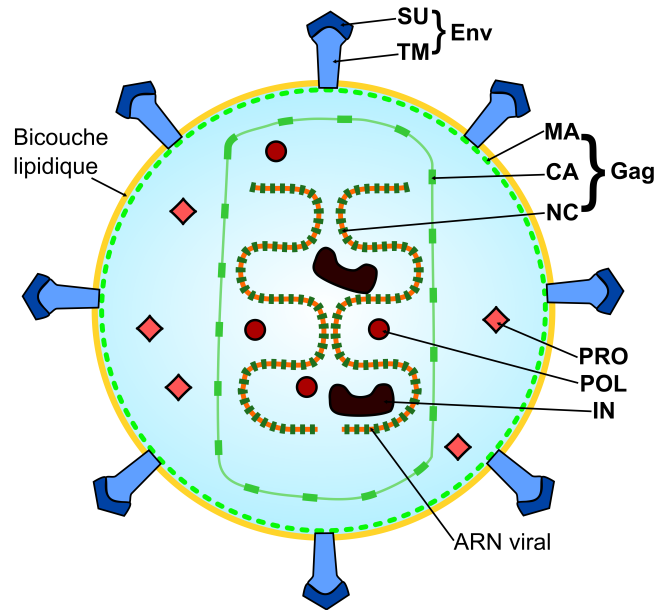


FIGURE 1.1 – Structure de la particule virale du HTLV-1

La particule virale du HTLV-1 présente les caractéristiques générales des *Retroviridae*. Les protéines structurales sont les suivantes : SU (protéine de surface), TM (protéine transmembranaire), MA (protéine de matrice), CA (protéine de capsid), NC (protéine de nucléocapsid), PRO (protéase), POL (transcriptase inverse) et IN (intégrase). L'ARN viral simple brin est présent en deux exemplaires, associés à la nucléocapsid.

munauté de chasseurs camerounais, et n'est associée à aucune pathologie [Calattini et al., 2005, Wolfe et al., 2005].

Le virus HTLV-4 a été mis en évidence dans la même communauté camerounaise, et l'équivalent STLV-4 a ensuite été découvert chez le gorille [Wolfe et al., 2005, LeBreton et al., 2014]. Dans le cas des PTLV-4, la transmission entre le singe et l'Homme médiée par la morsure de gorilles a été clairement mise en évidence [Richard et al., 2016].

d) Myélopathies associées à HTLV-1 Nous avons vu que HTLV-1 est un virus oncogène, à l'origine de l'ATL. Mais ce virus est également associé à d'autres pathologies non-oncogènes, regroupées sous le terme HAM/TSP, qui comprennent donc la Paraparésie Spastique Tropicale (TSP) et les autres myélopathies associées à HTLV. HTLV-1 a en effet été identifié chez des patients atteints de TSP, ainsi que chez d'autres patients atteints par un syndrome proche, caractérisé par une atteinte inflammatoire et neurodégénérative [Gessain et al., 1985, Osame et al., 1986]. Si la présence de HTLV-1 dans le liquide céphalo-rachidien suggérait fortement un lien entre le virus et la pathologie, cette causalité a été démontrée à l'occasion de la description d'une transmission de la maladie par transfusion de sang infecté [Gout et al., 1990].

La HAM/TSP se déclare principalement chez des adultes entre 30 et 50 ans, et se caractérise par une paralysie progressive partant des membres inférieurs. Cette pathologie s'accompagne d'une importante démyélinisation associée à une infiltration dans le système nerveux central des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et à une forte production de cytokines pro-inflammatoires. Notons que l'activation de la voie NF- κ B, voie cellulaire impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires et qui est l'objet d'étude du travail de thèse, joue un rôle dans la pathogenèse HAM/TSP. La physiopathologie de la HAM/TSP est encore mal comprise, et différentes hypothèses inflammatoires coexistent, impliquant un rôle des cytokines inflammatoires ou des lymphocytes T cytotoxiques qui induiraient une destruction tissulaire ou un effet auto-immun déclenché par cette inflammation chronique.

B.3. Les 7 virus oncogènes humains

L'inventaire des virus oncogènes humains continue avec la découverte des papillomavirus. L'hypothèse d'une oncogenèse virale à l'origine de cancers génitaux apparaît à Zur Hausen après l'identification de particules virales et de leur ADN dans diverses verrues [Zur Hausen et al., 1974]. Ayant observé que certaines verrues génitales pouvaient dégénérer en tumeurs, il se lance à la recherche d'ADN viral dans des tumeurs génitales, et y parvient en 1982, mettant au jour le pouvoir oncogène de plusieurs membres de la famille virale des *Papillomaviridae* [Zachow et al., 1982].

Les découvertes suivantes sont permises par les nombreuses avancées technologiques en matière de biologie moléculaire, et notamment la technique de PCR. Cette technique a en effet permis de détecter des transcrits viraux au sein de clones cellulaires issus de cas d'hépatites "non-A, non-B" [Choo et al., 1989]. Le virus de l'hépatite ainsi identifié, nommé C (HCV pour *Hepatitis C Virus*), membre des *Flaviviridae*, sera rapidement associé à des cas d'hépatocarcinomes [Colombo et al., 1989, Sarid and Gao, 2011].

En 1994, l'équipe de Yuang Chang et Patrick Moore identifiera la présence d'un agent infectieux au niveau des lésions tumorales spécifiques du sarcome de Kaposi, dont l'origine infectieuse est avérée depuis la démonstration de son caractère transmissible par voie sexuelle [Beral et al., 1990, Chang et al., 1994]. Le couple sera à nouveau à l'origine de la découverte du dernier des sept virus oncogènes décrits chez l'Homme, le Polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV), dont l'expression est détectée grâce à une méthode d'analyse bio-informatique dite soustractive, permettant de distinguer les transcrits d'origine exogène à l'intérieur d'une cellule [Feng et al., 2007, Feng et al., 2008]. Cette méthode est basée sur le séquençage haut-débit

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

de banques de cDNA extraites des cellules analysées. Les séquences obtenues sont alignées via l'algorithme *BLAST* au génome de l'hôte, et toutes celles montrant un alignement sont supprimées de la banque de séquences, laissant uniquement les séquences étrangères à l'hôte.

Ainsi, 7 virus oncogènes ont été décrits pour l'heure chez l'Homme, se répartissant au sein de différentes familles virales et responsables de diverses formes de cancers (Tableau 1.2). D'autres candidats ont été étudiés ces dernières années, comme le virus JSRV (pour *Jaagsiekte Sheep RetroVirus*), un β -retrovirus responsable de cancers pulmonaires chez les ovins, dont des séquences proches ont été retrouvées chez des donneurs de sang au Cameroun [De Las Heras et al., 2000, Morozov et al., 2004]. Nous allons maintenant nous pencher sur les bases moléculaires de l'oncogenèse virale.

Virus	Famille virale	Cancers associés	Découverte
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	<i>Herpesviridae</i>	Lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngé, lymphome de Hodgkin	1964
Virus de l'Hépatite B (HBV)	<i>Hepadnaviridae</i>	Hépatocarcinome	1967
Virus T-Lymphotrope Humain de type 1 (HTLV-1)	<i>Retroviridae</i>	Leucémie T de l'Adulte	1980
PapillomaVirus Humain (HPV)	<i>Papillomaviridae</i>	Carcinomes ano-génitaux et oropharyngés	1982
Virus de l'Hépatite C (HCV)	<i>Flaviviridae</i>	Hépatocarcinome, lymphome non-Hodgkinien	1989
Virus du Sarcome de Kaposi (KSHV)	<i>Herpesviridae</i>	Sarcome de Kaposi	1994
PolyomaVirus à Cellules de Merkel (MCPyV)	<i>Polyomaviridae</i>	Carcinome à cellules de Merkel	2008

FIGURE 1.2 – **Virus oncogènes humains**

C. Modalités moléculaires de l'oncogenèse virale

C.1. Rétrovirus oncogènes aigus et cis-activateurs chez l'animal

Parmi l'ensemble des virus oncogènes, les rétrovirus occupent une place particulière, car leur cycle viral passe par une intégration systématique de leur génome au sein du génome de l'hôte. La majorité des rétrovirus oncogènes promeut l'oncogenèse par la sur-expression ou l'expression de formes constitutivement actives de certains gènes, appelés proto-oncogènes, sur lesquels nous allons revenir.

L'étude de l'oncogenèse virale et de l'oncogenèse en général sont historiquement intimement liées. L'oncogenèse due au RSV a été étudiée suite au développement d'essais focaux par Temin. Cette expérience permet d'observer très rapidement la formation de *foci* de cellules transformées par le RSV, et ainsi de déterminer le potentiel oncogène de divers mutants viraux. Ces expériences reposent entièrement sur l'impressionnante efficacité oncogène du RSV, qualifié de virus oncogène aigu. Suite à ces études, un cadre de lecture situé en aval de l'enveloppe a été identifié comme facteur oncogène et nommé "*src*" (pour "*sarcoma*") [Wang et al., 1976]. Lors d'une expérience d'hybridation de séquences correspondant au gène *src* avec les génomes cellulaires de diverses espèces aviaires, l'équipe de Varmus et Bishop a identifié la présence de gènes similaires à ces oncogènes viraux dans le génome de cellules non-infectées [Stehelin et al., 1976]. Cette découverte, qui leur a valu le prix Nobel en 1989, prouve que les oncogènes viraux sont d'origine cellulaire. Ces gènes cellulaires sont alors appelés "*proto-oncogènes*", définis comme des facteurs cellulaires ayant une action proliférative et dont l'hyper-activation peut aboutir à un cancer. Les oncogènes viraux portés par ces virus oncogènes aigus sont issus d'événements de capture d'un proto-oncogène cellulaire (Figure 1.3). Dans le cas du RSV, la version virale *v-src* diffère de la version cellulaire *c-src* par l'absence d'un site de phosphorylation inhibitrice permettant la régulation de l'activité de *c-src*, et rendant *v-src* constitutivement actif.

La recherche sur les oncogènes rétroviraux a permis l'identification de nombreux proto-oncogènes cellulaires, généralement capturés en aval des gènes Gag et Env et formant ou non des fusions avec ces gènes. Parmi ces proto-oncogènes, citons des kinases comme Src ou Raf, des protéines G comme les membres de la famille Ras et des facteurs de transcription comme Fos et Myc, respectivement découverts grâce à l'étude des virus RSV, *3611 murine sarcoma virus*, *Kirsten murine sarcoma virus*, *FBJ osteosarcoma virus* et *Myelocytomatosis virus strain MC29* [Der, 1987, Maeda et al., 2008].

Les rétrovirus oncogènes chroniques comme le virus de la leucose aviaire (ou ALV) ont une action oncogène basée sur la cis-activation de proto-oncogènes cellulaires (Figure 1.3). Cette activation est médiée par une intégration préférentielle à proximité de certains de ces proto-oncogènes, parmi lesquels nous retrouvons de nombreux gènes cités précédemment, comme le gène *c-myc*, cis-activé par le virus ALV [Neel et al., 1981, Hayward et al., 1981].

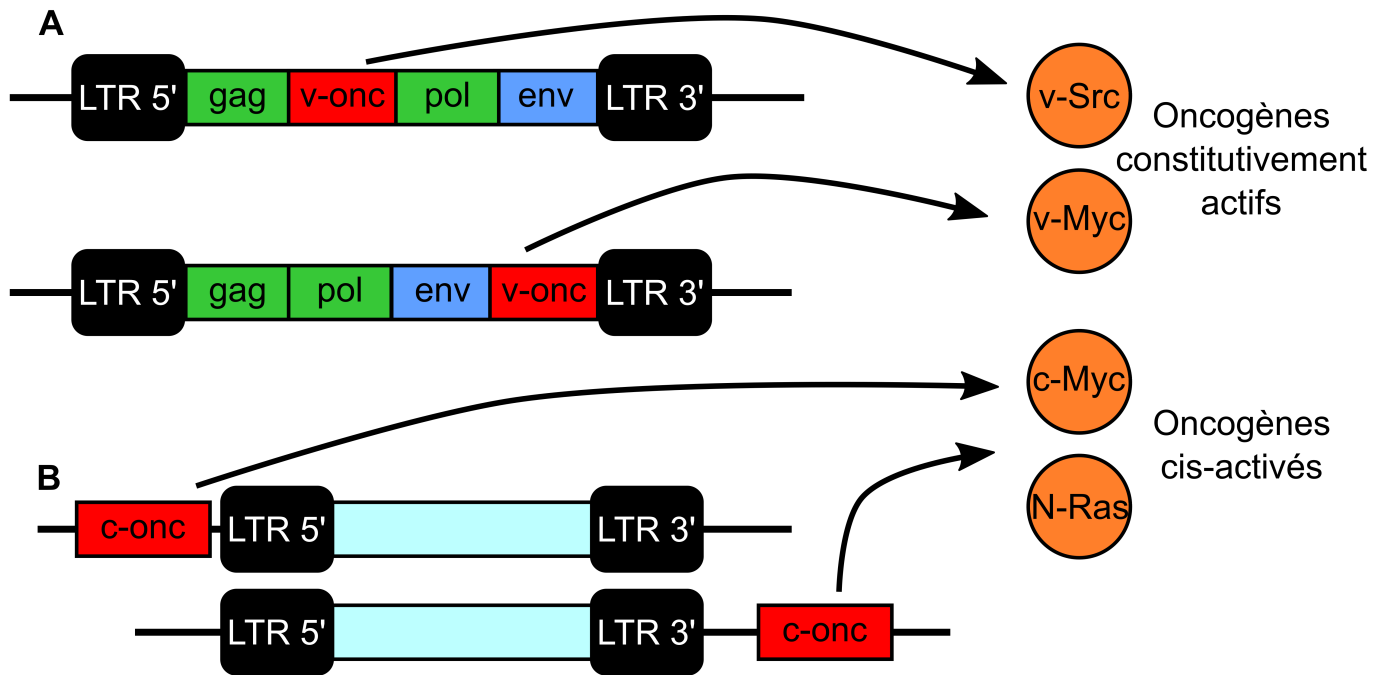


FIGURE 1.3 – Mécanismes d’oncogenèse par les rétrovirus aigus et cis-activateurs

Les rétrovirus oncogènes aigus (A) et cis-activateurs (B) promeuvent l’expression d’oncogènes viraux (v-onc) ou cellulaires (c-onc), soit en les exprimant dans leur propre génome après capture dans le cas des rétrovirus aigus (A), soit en activant leur expression par effet cis-activateur (B). Les modalités de cis-activation sont très diverses et ne sont pas toutes représentées.

NB : Ici, le facteur choisi pour illustrer la famille Ras est N-Ras, pour Neuroblastoma-Ras.

C.2. Virus oncogènes directs

a) **Cas des rétrovirus HTLV-1 et JSRV** D’autres rétrovirus oncogènes n’expriment pas d’oncogènes d’origine cellulaire et ne semblent pas clairement présenter d’activité cis-activatrice de ces proto-oncogènes au sein du génome de l’hôte. Parmi ces virus, nous pouvons citer notamment HTLV-1 et JSRV, qui sont à l’origine d’oncogenèses causées par des dérégulations de la physiologie cellulaire médiées par un ou plusieurs facteurs oncogènes viraux.

Ces oncoprotéines virales sont capables d’interférer avec diverses voies de signalisation cellulaire, notamment les voies de prolifération et de survie au sein desquelles sont impliqués certains

proto-oncogènes déjà abordés. Ces voies principales sont MAPK (passant par Ras et Raf), Akt et NF- κ B. Comme chez de nombreux rétrovirus oncogènes animaux, la protéine d'enveloppe du virus JSRV est directement capable d'interférer avec les voies Ras et Src (intervenant dans de nombreuses voies de signalisation, comme les voies MAPK et Akt) par le biais d'interactions protéiques et est ainsi directement porteuse d'une activité oncogène. Dans le cas de HTLV-1, les facteurs oncogènes sont Tax et HBZ, sur lesquels nous reviendrons [Maeda et al., 2008].

b) Généralisation aux virus oncogènes humains Ce mécanisme d'oncogenèse directe médiée par un oncogène viral est généralisable à tous les virus oncogènes caractérisés chez l'Homme à l'heure actuelle. Ces virus codent des facteurs capables de promouvoir la prolifération en interférant notamment avec les voies de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Les cibles principales sont le suppresseur de tumeur Rétinoblastome-Rb (ciblé par les facteurs HPV-E7, KSHV-LANA, EBV-EBNA3C, HTLV-Tax, HBV-HBx, HCV-NS5B) dont l'inhibition promeut le cycle cellulaire, ainsi que le suppresseur de tumeur p53 (ciblé par les facteurs HPV-E6, KSHV-LANA et vIRF1, HTLV-Tax, HBV-HBx, HCV-core, NS3 et NS5) dont l'inhibition réprime l'apoptose [Chaurushiya and Weitzman, 2009]. Ces virus présentent également une capacité générale à interférer avec diverses voies de survie cellulaire, comme la voie NF- κ B (ciblée par EBV-LMP1, HBV-HBx, HCV-NS5A et core, HPV-E2 et E6, KSHV-vFLIP et HTLV-Tax), sur laquelle nous reviendrons plus en détail dans le cadre de l'oncogenèse médiée par HTLV-1 [Sun and Cesarman, 2011, Mosialos, 1997, Sun and Karin, 2008, Da Costa et al., 2016].

D. La question de la causalité des virus oncogènes

a) Prévalence oncogène dans le cadre de l'infection par les virus oncogènes humains Pour tous les exemples humains que nous venons de décrire, le chemin entre la démonstration d'une association entre oncogenèse et virus et l'établissement clair de la causalité est généralement long [Sarid and Gao, 2011]. Un bon exemple historique est fourni par le cas du virus HBV, dont l'impact épidémiologique sur la survenue d'hépatocarcinomes n'a été démontré qu'en 1981, soit près de 15 ans après la découverte de son association avec cette pathologie [Beasley et al., 1981]. Cette difficulté est notamment liée au fait que, contrairement aux virus oncogènes aigus comme le RSV, la survenue d'un cancer chez les personnes infectées est loin d'être systématique.

Ainsi, la proportion de personnes infectées déclarant un cancer est de 5 % pour HTLV-1, de moins de 2 % pour HBV, entre 1 et 4 % pour HCV et largement moins de 10 % pour HPV. L'infection par EBV concerne 95 % de la population mondiale, à mettre en regard avec le nombre de cas de lymphome de Burkitt, bien que le virus soit également associé à certains carcinomes gastriques et nasopharyngés. Enfin, le virus KSHV n'est à l'origine d'une oncogénèse que dans un contexte d'immunosuppression.

Cette faible pathogénicité pour des virus dont il a pourtant été démontré qu'ils ont un effet prolifératif sur les cellules peut sembler étonnante. Mais ce hiatus est explicable au regard des différentes étapes menant à la survenue d'un cancer, sur lesquelles nous allons maintenant nous pencher.

b) Les différentes étapes de l'oncogénèse dans le contexte des virus oncogènes

On peut distinguer trois étapes dans l'apparition d'un cancer. Nous définirons tout d'abord l'immortalisation comme l'acquisition d'une capacité à proliférer de manière illimitée, et donc d'un échappement aux phénomènes de sénescence et de mort cellulaire. Cette immortalisation est suivie par la transformation, que nous définirons comme l'acquisition d'une indépendance aux facteurs de croissances et la perte de l'inhibition de contact pour les cellules qui y sont sujettes. Cette étape est la conséquence d'anomalies génétiques et de mutations supplémentaires apparaissant spontanément dans les cellules immortalisées, qui passent donc d'un stade où elles ne sont plus limitées par la sénescence à un stade où leur prolifération est constitutivement activée. Enfin, les cellules transformées subissent une troisième étape qui les conduit à développer des tumeurs et à acquérir un caractère invasif. Cette dernière étape, qui constitue avec les deux précédentes le processus global d'oncogénèse, est caractérisée par l'acquisition de nombreuses autres mutations ayant pour conséquences notamment la production de facteurs pro-angiogéniques et diverses transformations métaboliques.

Si nous appliquons ces concepts à l'oncogénèse virale, caractérisée par la présence de facteurs portant une fonction directement oncogène, nous nous apercevons que la différence entre facteur d'immortalisation et facteur de transformation est très ténue. En effet, les facteurs viraux qui promeuvent la prolifération ont également un impact sur la survenue de mutations par l'activation du cycle cellulaire qu'ils induisent, et ont donc également une activité transformante. C'est cette activité transformante qui a été étudiée pour les différents facteurs oncogènes viraux, et sur laquelle nous allons nous focaliser concernant HTLV-1. Ces facteurs promeuvent le déséquilibre initial induisant ensuite une accumulation de mutations au cours du temps.

L'étape critique du processus oncogène se situe donc au niveau du passage entre la transformation et la fin du processus oncogène. Et c'est le système immunitaire de l'hôte qui en est le principal acteur, par le contrôle de la prolifération des différents clones transformés qui apparaissent au fur et à mesure de l'accumulation des mutations.

Nous avons donc vu au cours de cette partie les différents mécanismes de l'oncogenèse virale. Historiquement, l'étude de l'oncogenèse virale est liée à la compréhension globale des dynamiques de l'apparition des cancers et a permis la description et la compréhension de nombreuses voies de signalisation cellulaires. Le travail de thèse ici présenté se place dans cette optique pour le cas de l'oncogenèse médiée par le virus HTLV-1. Nous allons maintenant nous intéresser au cycle viral de ce virus, comprenant la promotion de l'oncogenèse.

II Aspects épidémiologiques, cellulaires et moléculaires de l'infection par HTLV-1

A. Épidémiologie de l'infection par HTLV-1

A.1. Infection HTLV-1 à l'échelle du globe

Les études épidémiologiques concernant HTLV-1 se basent sur des données issues de banques de donneurs de sang ou de dépistages effectués chez les femmes enceintes. La population ainsi testée comporte de nombreux biais sociaux et démographiques, et la prévalence est très probablement sous-estimée [Gessain and Cassar, 2012]. Des tests plus systématiques sont parfois effectués sur des populations particulières, notamment en Afrique ou en Australie, auprès des populations aborigènes.

Le diagnostic est basé sur la détection d'anticorps spécifiques par test ELISA (pour *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) ou par expérience d'agglutination, avant une confirmation sérologique par une autre méthode d'immuno-détection (immunofluorescence ou immunoblot) et éventuellement une confirmation de l'infection par PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*).

Les données actuelles nous permettent d'estimer à plus de 10 millions le nombre de personnes infectées dans le monde, avec de forts foyers d'endémicité au Japon, en Afrique sub-saharienne occidentale, dans les Caraïbes et les régions avoisinantes (sud de l'Amérique du Nord et nord de l'Amérique du Sud) ainsi qu'en Australo-Mélanésie abritant des sous-populations à très forte prévalence, comme les aborigènes australiens (Figure 1.4) [Einsiedel et al., 2016].

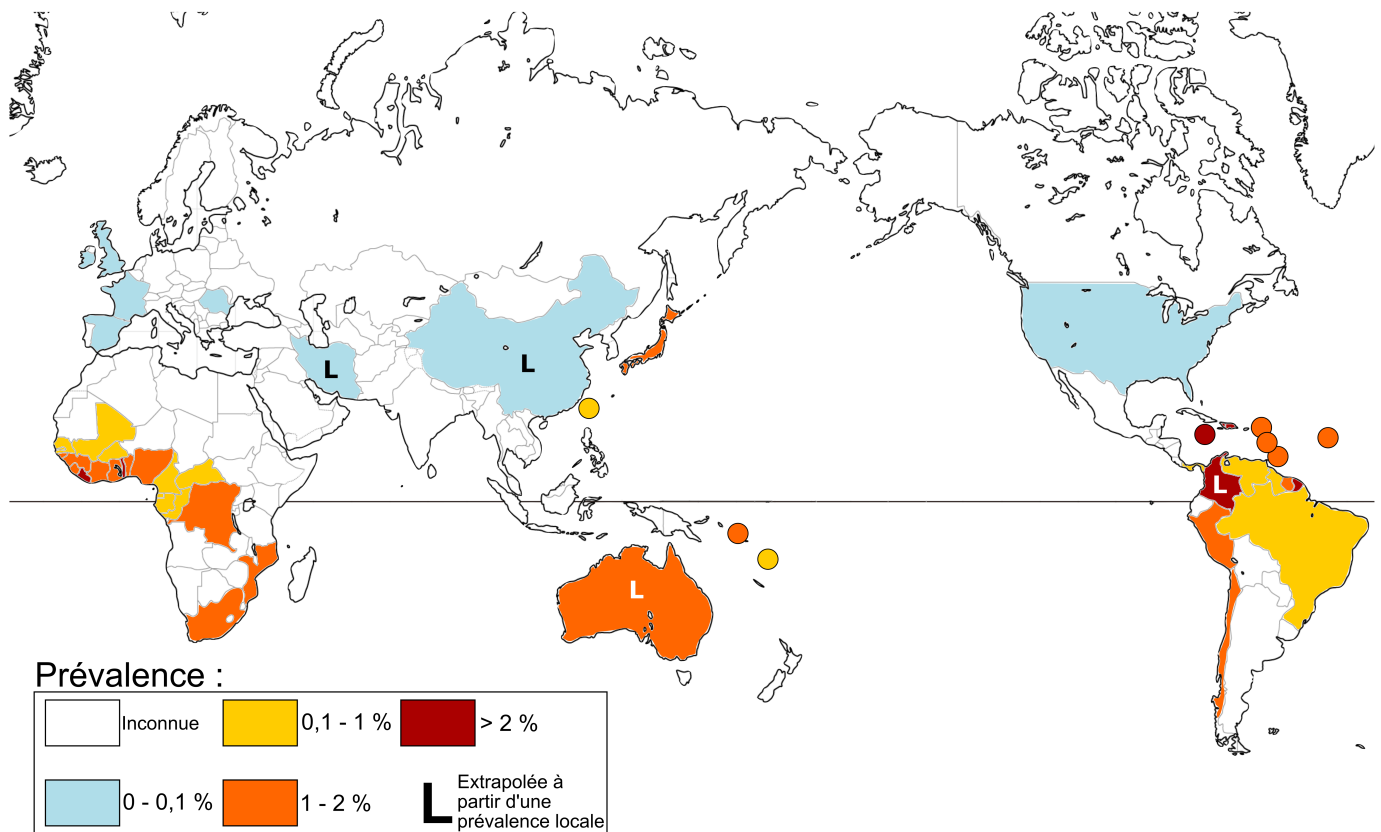


FIGURE 1.4 – Prévalence du virus HTLV-1 à l'échelle du globe

La prévalence est calculée à partir des estimations supérieures provenant de l'étude publiée par Antoine Gessain et Olivier Cassar [Gessain and Cassar, 2012]. Les pays en bleu présentent une prévalence connue inférieure à 0,1 %, les pays en jaune présentent une prévalence située entre 0,1 et 1 %, les pays en orange présentent une prévalence située entre 1 et 2 %, les pays en rouge présentent une prévalence supérieure à 2 %. Les pays dont les données présentées correspondent à une localité précise sont indiqués par un L.

Fond de carte originaire du site <http://english.freemap.jp> - distribué sous licence CC-BY

A.2. Modes de transmission du virus

La transmission du virus HTLV-1 est principalement verticale, près de 20 % des enfants nés de mères infectées étant porteurs du virus [Wiktor et al., 1993]. L'allaitement semble avoir une part prépondérante dans cette transmission. Une étude récente portant sur une cohorte japonaise montre que la transmission verticale passe de 20 % à 2 % chez des mères ayant recours à du lait conditionné, bien que ce type de mesures n'empêche pas totalement la transmission et est difficile à mettre en place en pratique [Moriuchi et al., 2017].

La transmission horizontale existe également, principalement par voie sexuelle, ainsi que par transfusion sanguine.

A.3. Diversité génétique du virus HTLV-1

Les études épidémiologiques permettent de détailler la diversité génétique du virus HTLV-1, bien que ce virus soit stable génétiquement par rapport aux autres rétrovirus du fait de l'expansion clonale des cellules infectées. À l'heure actuelle, on dénombre sept sous-types de HTLV-1 [Gessain and Cassar, 2012]. Le sous-type HTLV-1A est cosmopolite et peut à son tour être subdivisé en plusieurs sous-groupes dont certains sont régionaux (notamment au Japon et en Afrique de l'ouest, ce dernier étant également présent en Amérique par le déplacement des populations). Le sous-type HTLV-1C est présent principalement en Australo-Mélanésie, alors que les sous-types HTLV-1B, D, E, F et G circulent en Afrique, avec des préférences géographiques locales (les sous-types B, E, F et G circulent en Afrique centrale, le sous-type D semble spécifique aux populations pygmées).

Chaque sous-type de HTLV-1 présente une importante proximité avec la souche de son équivalent simien (STLV). Chaque sous-type semble être lié à un événement de transmission du Singe à l'Homme, à l'exception notable du sous-type A [Gessain and Cassar, 2012].

B. Cycle viral d'HTLV-1

B.1. Cellules cibles et récepteurs d'entrée

a) **Tropisme cellulaire du virus HTLV-1** Le virus HTLV-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4⁺ *in vivo*, qui renferment plus de 90 % de l'ADN proviral détectable en PCR chez une personne infectée, et ce quel que soit le statut clinique [Richardson et al., 1990]. D'autres sous-types lymphoïdes sont susceptibles à l'infection *in vivo*, comme les lymphocytes T CD8⁺ [Hanon et al., 2000]. HTLV-1 est également capable d'infecter des cellules immunitaires appartenant à la lignée myéloïde, comme des monocytes ainsi que des astrocytes, décrits dans le cadre du développement des maladies inflammatoires de type HAM/TSP [Lehky et al., 1995]. L'infection des monocytes est à l'origine de modifications des caractéristiques de ces cellules, et leur infection est proportionnelle à la charge virale [de Castro-Amarante et al., 2016]. L'infection de cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et plasmacytoïdes (pDC) a également été décrite [Hishizawa et al., 2004, Jones et al., 2008]. Enfin, la possibilité d'infection de divers sous-types de cellules endothéliales et épithéliales a également été mise en évidence, notamment celles de l'endothélium cérébral, jouant un rôle dans les atteintes neuronales ayant lieu dans le cadre des pathogénèses HAM/TSP [Afonso et al., 2008].

Malgré cette grande diversité, les lymphocytes CD4⁺ restent le compartiment principal de l'infection par HTLV-1 *in vivo*. Parmi les lymphocytes T, les CD4⁺ présentent la meilleure efficacité d'expression du virus lors d'expériences de néo-infection en co-culture avec des cellules infectées [Newbound et al., 1996]. D'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques dérivées de monocytes semblent plus susceptibles à l'infection par contact cellulaire *in vitro* [Alais et al., 2015]. Notons que les différences de charge virale entre les sous-types cellulaires ne peuvent toutefois pas se résumer à des différences d'expression, la prolifération cellulaire participant pour beaucoup à la charge virale, comme nous le verrons ultérieurement.

b) Complexe de récepteurs au virus HTLV-1 L'entrée du virus HTLV-1 est médiée par l'interaction entre la protéine Env et les récepteurs cellulaires. Les récepteurs interagissent avec la sous-unité SU de l'enveloppe, provoquant la libération du peptide fusion situé en position amino-terminale de sa sous-unité TM [Pique et al., 1990, Rosenberg et al., 1997].

La réception du virus fait intervenir plusieurs facteurs qui constituent le complexe récepteur de HTLV-1. Le facteur principal est le récepteur GLUT-1 (*Glucose Transporter-1*), dont la surexpression augmente sensiblement la susceptibilité de lignées basalement peu permissives au virus [Manel et al., 2003, Coskun and Sutton, 2005]. Le rôle des facteurs Neuropiline-1 et des Héparanes Sulfates ProtéoGlycanes (HSPG) a également été mis en évidence, le premier étant capable de lier la protéine d'enveloppe et les seconds jouant un rôle dans l'adsorption des virus sur les cellules CD4⁺ [Ghez et al., 2006, Jones et al., 2005, Lambert et al., 2009].

L'entrée du virus HTLV-1 dans les cellules-cibles repose donc sur des facteurs au profil d'expression large, ce qui peut sembler contradictoire avec le tropisme cellulaire restreint *in vivo*. Il a été montré que la Neuropiline-1 est sur-exprimée à la surface des lymphocytes T activés, ce qui est cohérent avec le tropisme du virus [Ghez et al., 2006]. Le mode de transmission est probablement un autre facteur d'explication du tropisme cellulaire de HTLV-1, comme nous le verrons plus tard.

B.2. Intégration et expression du génome viral

a) Intégration du génome d'HTLV-1 Comme tous les rétrovirus, HTLV-1 passe par une étape de transcription inverse suivie de l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte. Cette intégration est dépendante de l'intégrase virale, qui fixe les extrémités du brin d'ADN formé lors de la transcription inverse et catalyse l'hydrolyse des extrémités 5' et 3', la "*capture*" de l'ADN cible, ainsi que le transfert des brins viraux au sein du génome receveur, finalisé par

II. ÉPIDÉMIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE DE L'INFECTION HTLV-1

une étape de réparation médiée par la machinerie cellulaire.

Comme nous l'avons vu, la sélectivité de l'intégration rétrovirale est une question particulièrement importante dans le cadre de virus oncogènes, qui peuvent promouvoir la transformation cellulaire en cis-activant des proto-oncogènes cellulaires situés à proximité des sites d'intégration. La question de l'existence de *points chauds* d'intégration pour HTLV-1 est donc importante à considérer. Or cette question est encore débattue actuellement.

L'intégration du génome viral de HTLV-1 n'est pas aléatoire, comme c'est le cas de tous les membres de la famille des *Retroviridae*. HTLV-1, comme HIV-1, semble s'intégrer préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives [Schröder et al., 2002, Meekings et al., 2008]. La séquence ciblée est déterminée par une région consensus récemment décrite comme non-palindromique, partagée par différents rétrovirus, notamment HIV-1 [Kirk et al., 2016]. L'intégration dans des régions proches de proto-oncogènes cellulaires a été décrite comme fréquente, mais son influence sur la pathogenèse est débattue [Cook et al., 2014]. Cette intégration de HTLV-1 semble conférer un avantage pour la survie des clones de lymphocytes activés *in vivo*, sans toutefois jouer un rôle significatif dans l'oncogenèse [Cook et al., 2014]. L'environnement du site d'intégration de HTLV-1, comme la proximité d'autres gènes ayant la même orientation, semble avoir un impact sur la taille des clones [Melamed et al., 2013].

b) Gènes exprimés par HTLV-1 Le génome du virus HTLV-1 s'étend sur 8,5 kb. Comme de nombreux génomes viraux, il est caractérisé par une forte densité génétique, s'exprimant par de nombreux chevauchements de cadres de lecture et divers degrés d'épissage notamment, aboutissant à la production d'une quinzaine de protéines (Figure 1.5). Parmi ces gènes, on trouve bien sûr les régions génétiques rétrovirales minimales : les gènes *gag*, *pro* et *pol*, codant les protéines structurales et enzymatiques en passant par un transcrit non-épissé, ainsi que le gène *env*, codant les protéines d'enveloppe en passant par un transcrit simplement épissé. En plus de ces facteurs communs à tous les rétrovirus, HTLV-1 code également des facteurs régulateurs et auxiliaires dans sa région pX.

Parmi les différents cadres de lecture de la région pX, l'ORF (pour *Open Reading Frame*) I simplement épissé code le facteur p12. L'ORF II code le facteur p13 après un épissage simple, et le facteur p30 après un épissage complet. Il en va de même pour l'ORF III, codant le facteur p21 après épissage simple et la protéine Rex après épissage complet. L'ORF IV code la protéine Tax après épissage complet. Le dernier ORF a l'originalité d'être codé en anti-sens, à partir du LTR 3' et code la protéine HBZ, dont il existe une forme épissée ainsi qu'une forme non-épissée

(Figure 1.5).

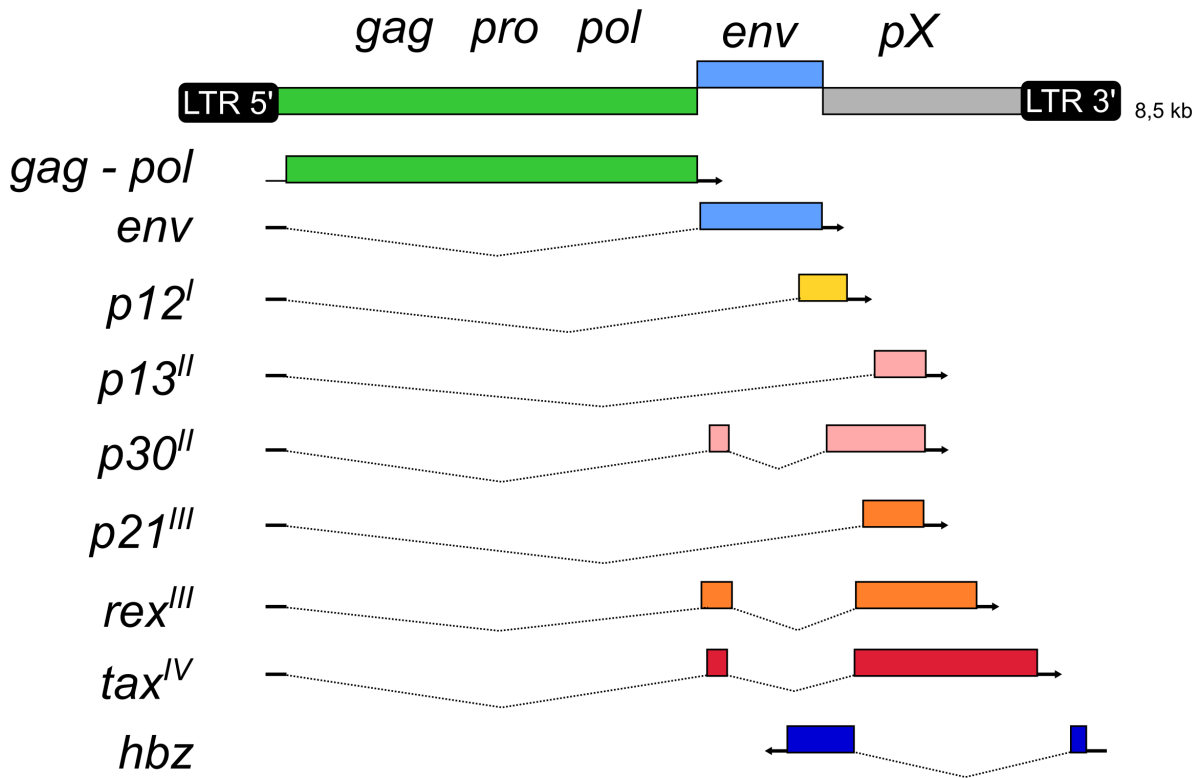


FIGURE 1.5 – Génome du provirus HTLV-1

Le génome du virus HTLV-1 encode, en plus des protéines structurales et enzymatiques Gag, Pol et Env, des facteurs régulateurs et auxiliaires dans sa région pX. Ces facteurs se répartissent sur quatre cadres de lecture différents et sont caractérisés par des degrés d'épissage variables. Notons le cas du facteur HBZ, qui est exprimé en anti-sens à partir du LTR 3'.

Inspiré de [Matsuoka and Jeang, 2007]

c) **Fonction des facteurs régulateurs et auxiliaires** Les deux facteurs régulateurs principaux sont Rex et Tax. Ces facteurs sont nécessaires à l'expression virale *in vitro* comme *in vivo*. Ils permettent tous les deux l'expression complète du génome proviral. Rex permet l'export nucléaire des ARN viraux non-complètement épissés et Tax active la transcription du provirus, comme nous le verrons plus loin. HBZ et p30 ont une fonction régulatrice inhibitrice, p30 étant responsable de la séquestration nucléaire des facteurs Tax et Rex, et HBZ inhibant l'action de Tax sur le provirus [Nicot et al., 2004, Clerc et al., 2008] (Figure 1.6). Concernant la régulation de l'expression provirale, il est important de noter que l'augmentation de la charge virale chez les personnes infectées par HTLV-1 est principalement due à l'expansion clonale des cellules infectées, avec une faible activité de réplication [Gessain et al., 1992]. Dans ce contexte, une forte charge virale peut donc être associée à une faible expression virale. En parallèle de leurs effets sur l'expression provirale, les facteurs Tax et HBZ portent de nombreuses fonctions liées à l'oncogenèse virale, sur lesquelles nous reviendrons.

La protéine auxiliaire p12 existe sous deux formes, une forme complète localisée au réticulum endoplasmique et une forme tronquée (p8) localisée à la membrane plasmique, au niveau de radeaux lipidiques [Fukumoto et al., 2009]. Dans le réticulum, p12 inhibe la maturation des chaînes lourdes du CMH-I (pour *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*), induisant sa dégradation, ce qui joue un rôle potentiel dans l'échappement immunitaire de HTLV-1 [Johnson et al., 2001]. P12 joue un rôle dans la transformation des cellules infectées en interagissant avec le récepteur de l'IL-2, à l'origine d'une activation de la voie de STAT, aboutissant notamment à l'expression de gènes prolifératifs, ainsi que d'une baisse de la dépendance à l'IL-2 exogène des cellules T [Nicot et al., 2001]. Cet effet prolifératif de p12 semble être complété par son influence sur l'activation du facteur NFAT (pour *Nuclear Factor of Activated T-cells*), régulant notamment l'expression de l'IL-2. Des effets à la fois activateurs et inhibiteurs de p12 sur NFAT ont été décrits, si bien que l'effet net de p12 sur ce facteur reste inconnu [Ding et al., 2003, Kim et al., 2003]. L'effet de l'infection par HTLV-1 sur NFAT semble globalement activateur, NFAT étant activé dans diverses lignées cellulaires infectées par HTLV-1, ainsi que dans des cellules dérivées de patients ATL [Good et al., 1997, Silbermann et al., 2008]. La forme p8 est quant à elle impliquée dans l'établissement de contacts cellule-cellule, facilitant la transmission virale par ce biais, comme nous le verrons plus tard [Van Prooyen et al., 2010].

La protéine auxiliaire p13 est quant à elle associée à la membrane interne mitochondriale, avec de multiples effets. Notamment, p13 provoque une dérégulation globale des flux ioniques

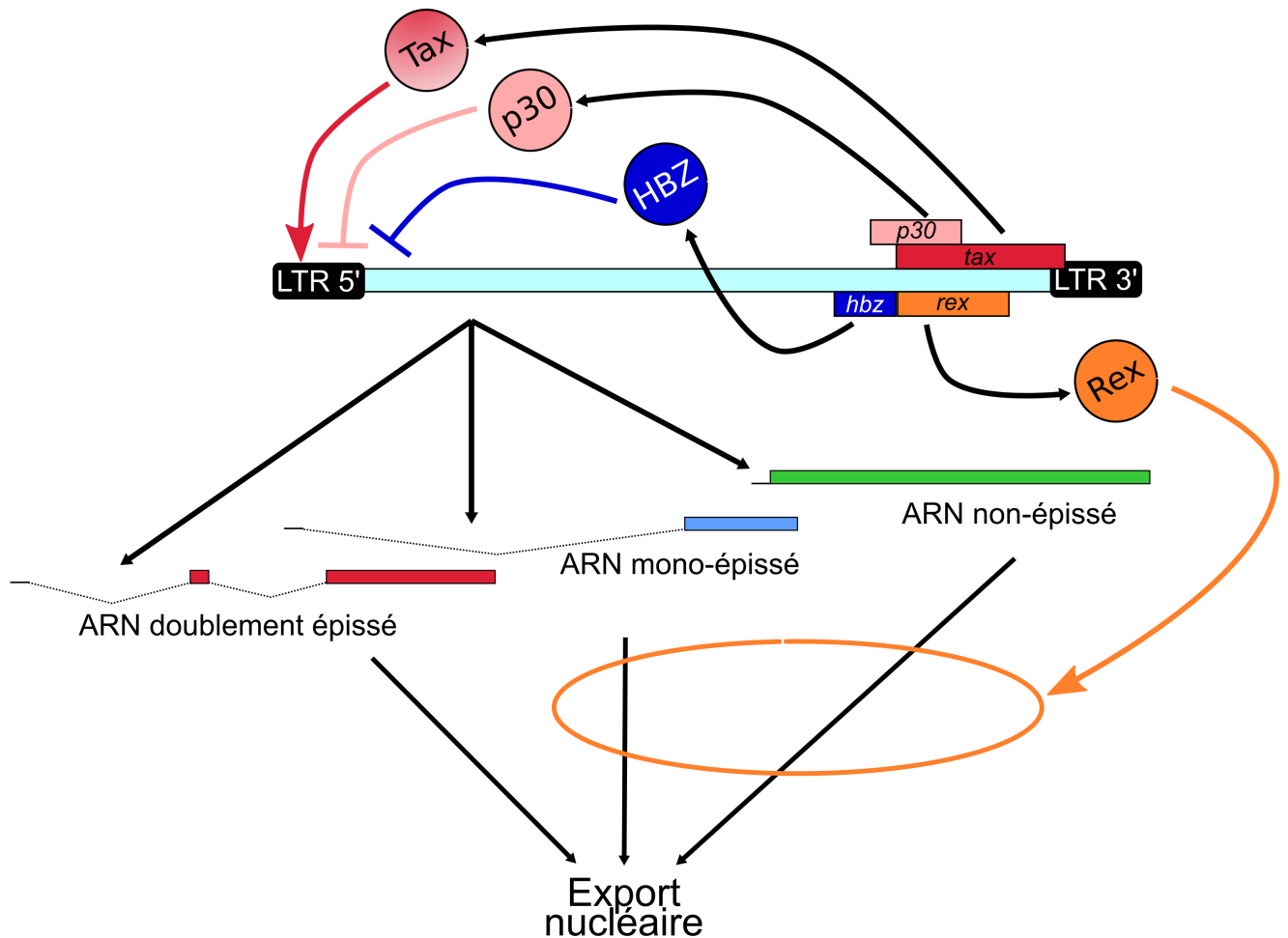


FIGURE 1.6 – Régulation de l'expression du génome proviral

Le niveau transcriptionnel du génome proviral est déterminé principalement par les facteurs Tax, p30 et HBZ. Tax est un activateur du LTR 5', et son action est réprimée par HBZ ainsi que par p30, responsable de la séquestration nucléaire de Tax. Ainsi, HBZ et p30 sont porteurs d'effets répresseurs sur le LTR 5'. Rex permet l'export nucléaire des transcrits non-complètement épissés. Le facteur p30 est également responsable de la séquestration nucléaire de Rex, ce qui amplifie l'effet inhibiteur de p30 sur la réplication virale.

cellulaires, augmentant la production des ROS (pour *Reactive Oxygen Species*), ce qui a pour effet de favoriser l'activation des cellules T quiescentes [Silic-Benussi et al., 2010].

B.3. Production de particules virales et transmission de cellule à cellule

a) **Assemblage des particules néo-formées** Après production des protéines structurales et de l'ARN génomique, ces éléments migrent vers la membrane plasmique, lieu d'assemblage des particules virales. Le virus HTLV-1 présente un mécanisme original dans ce domaine, les

II. ÉPIDÉMIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE DE L'INFECTION HTLV-1

protéines Gag étant dirigées vers la membrane sous forme de monomères et formant des oligomères une fois recrutées à la membrane, à l'inverse de ce qui est décrit notamment pour HIV-1, pour lequel l'oligomérisation de Gag a lieu dans le cytoplasme avant l'adressage membranaire [Maldonado et al., 2014, Mansky et al., 2017]. HTLV-1 est par contre un rétrovirus plus classique dans son efficacité de production, présentant en effet de nombreuses particules virales incomplètes, notamment avec des structures de capsid partiellement formées [Cao et al., 2014].

b) Transmission cellulaire du HTLV-1 La transmission du virus HTLV-1 est particulière, car elle est caractérisée par une très faible quantité de virus libre détecté chez les patients, et l'infektivité de ce virus libre est très peu importante [Alais et al., 2015]. Le principal mode de transmission repose sur l'établissement de contacts cellule-cellule, principalement par la mise en place d'une synapse virologique (nommée en référence à la synapse immunologique), capable de transmettre le virus entre deux lymphocytes T CD4⁺ ou entre lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [Igakura et al., 2003]. La transmission virale depuis des cDC infectées ou ayant simplement capturé le virus à des lymphocytes T suggère fortement l'établissement de cette synapse entre ces deux types cellulaires [Jones et al., 2008, Rizkallah et al., 2017].

La mise en place de cette synapse repose sur l'interaction de divers facteurs, principalement les facteurs ICAM (pour *IntraCellular Interaction Molecule*), VCAM (pour *Vascular Cell Adhesion Molecule*) et LFA1 (pour *Lymphocyte Function-associated Antigen*), ainsi que sur d'importantes modifications de la polarité des cellules infectées [Tanaka et al., 1996, Nejmedine et al., 2005]. La ré-orientation du centre organisateur des microtubules (noté MTOC), ainsi que les modifications du cytosquelette et des facteurs d'adhésion à l'origine de la mise en place de cette synapse sont gouvernés par des facteurs viraux, notamment par l'action de la protéine Tax.

Une fois la synapse établie, la transmission virale se fait par l'intermédiaire de ce contact par passage direct dans la fente synaptique [Majorovits et al., 2008]. La transmission peut également se faire par le biais de structures riches en matrice extra-cellulaire présentes à la surface des cellules infectées productrices, appelées *biofilms viraux* [Pais-Correia et al., 2010] (Figure 1.7).

L'importance de la synapse virologique pour la transmission virale porte un éclairage nouveau sur le tropisme de HTLV-1. Nous avons en effet vu que ce tropisme n'est pas explicable uniquement par le complexe récepteur utilisé par le virus. Or, la synapse requiert de nombreux

facteurs spécifiques pour se mettre en place, facteurs principalement exprimés par les cellules immunitaires, ce qui explique la restriction du tropisme viral *in vivo*. D'autres facteurs qui promeuvent les interactions cellulaires expliquent les préférences plus fines de tropisme du virus. C'est le cas de la fréquente surexpression de la chimiokine CCL22 par les cellules infectées. Ce ligand est reconnu par le récepteur CCR4, augmentant la transmission aux cellules exprimant de forts niveaux de CCR4. Cette transmission préférentielle pourrait être un des facteurs conduisant à la forte expression du récepteur CCR4 à la surface des cellules ATL [Yoshie et al., 2002, Hieshima et al., 2008].

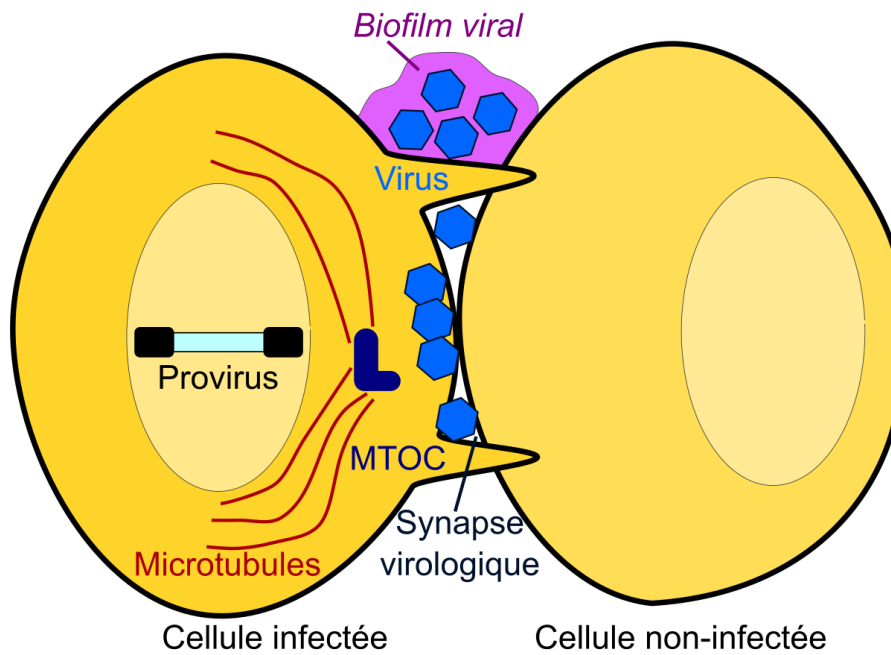


FIGURE 1.7 – Transmission cellule-cellule du virus HTLV-1

La transmission du virus HTLV-1 est médiée principalement par les contacts cellule-cellule et l'établissement d'une synapse virologique. Suite à un réarrangement du cytosquelette consécutif à une relocalisation du centre organisateur des microtubules (MTOC), les particules virales sont adressées à la synapse et peuvent infecter la cellule voisine. Les virus peuvent également infecter les cellules voisines par le biais de structures appelées *biofilm viral*.

Inspiré de [Rizkallah et al., 2015]

C. La réponse immunitaire envers HTLV-1

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'infection par le virus HTLV-1 ne se traduit pas toujours par l'établissement d'une pathologie, et même dans ce dernier cas, d'importantes variations cliniques existent entre les sous-types de pathologies. Les études que nous avons citées précédemment n'ont pas montré de facteur viral à l'origine de cette diversité. Les facteurs contrôlant le devenir de l'infection sont donc à chercher au niveau de l'interaction entre le virus et l'hôte.

Parmi les facteurs de l'hôte impliqués dans le devenir de l'infection par HTLV-1, de premières études ont montré l'association entre la survenue de maladies du spectre HAM/TSP avec certains allèles des gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C [Jeffery et al., 2000]. Ces variations montrent l'importance de la réponse T sur l'infection par le virus HTLV-1. Ces données s'ajoutent au constat que l'expression virale augmente fortement lors de la mise en culture de cellules issues de patients, manipulation qui place les cellules dans un environnement qui diffère par plusieurs paramètres de celui dans lequel elles évoluent au sein de l'organisme hôte, notamment par l'absence de système immunitaire. Des études récentes réalisées sur les caractéristiques génétiques de cellules ATL ont également montré, parmi de nombreux autres facteurs, de fréquentes mutations dans ces gènes du CMH-I [Kataoka et al., 2015]. Ces données suggèrent que ces mutations sont bénéfiques pour l'échappement viral.

L'infection par le virus HTLV-1 est persistante. Nous considérerons ici la définition de la persistance virale désignant toutes les infections non-aiguës, englobant les cas des infections latentes (avec des périodes d'absence totale de réplication virale) et des infections chroniques (avec des périodes de faible expression et multiplication virales, mais qui restent non-nulles) [Maréchal, 2007]. La latence clinique observée lors de l'infection par HTLV-1 peut être expliquée soit par une latence virale, soit pas une chronicité virale rendue invisible par le système immunitaire. Ces considérations renforcent l'intérêt d'étudier la réponse immunitaire à ce virus, sur laquelle nous allons maintenant nous pencher.

C.1. Réponse adaptative à HTLV-1

Réponse cytotoxique La réponse adaptative cytotoxique est médiée par les lymphocytes T CD8⁺ (CTL, pour *Cytotoxic T Lymphocytes*), capables d'induire spécifiquement la lyse de cellules infectées. Une forte réponse CTL a été mise en évidence chez les patients HAM/TSP, ainsi que les porteurs asymptomatiques (AC, pour *Asymptomatic Carriers*), ciblant principalement les protéines codées par la région pX, notamment la protéine Tax [Jacobson et al., 1990, Pique

et al., 2000].

Cette forte pression immunitaire sur Tax est à mettre en regard de la diminution de l'expression de Tax après les phases aigües de l'infection, et son taux d'expression est fortement réduit dans les cas d'ATL (couramment décrit à moins de 40 % des cellules, mais des données plus récentes décrivent moins de 2 % de cellules ATL exprimant Tax) et à moins de 60 % des cellules infectées chez les patients HAM/TSP [Melamed et al., 2013, Matsuoka and Jeang, 2007, Kataoka et al., 2015]. Récemment, il a été montré que la réponse CTL ciblant le facteur HBZ, bien que moins systématique que la réponse ciblant Tax, est bénéfique pour le contrôle des cellules infectées, la reconnaissance de HBZ par les CTL étant significativement plus forte chez les porteurs asymptomatiques en comparaison aux patients HAM/TSP [MacNamara et al., 2010]. Ces résultats suggèrent que la réponse CTL ciblant HBZ pourrait être un facteur déterminant l'issue de l'infection HTLV-1.

Dans le cas particulier des patients ATL, la réponse CTL semble déterminante, le dysfonctionnement de la réponse CTL étant un probable pré-requis au développement de la pathologie, au sein des patients présentant une forte charge provirale [Takamori et al., 2011, Kannagi et al., 2011]. Certaines études suggèrent que ce dysfonctionnement est entretenu par l'action des lymphocytes T régulateurs (T_{REG}), dont la fréquence est élevée parmi les lymphocytes circulants [Ohshima, 2015]. Cette fréquence est due à la promotion par HTLV-1 de l'expression de divers marqueurs des T_{REG} , et également à un effet probable de la sur-expression de la chimiokine CCL22, médiée par Tax dans les cellules infectées. Il a en effet été montré que cette chimiokine promeut la migration et la survie des cellules T_{REG} exprimant le facteur de transcription FoxP3 [Toulza et al., 2010].

C.2. Réponse innée à HTLV-1

a) Effets de l'interféron sur l'infection HTLV-1 Si l'importance fonctionnelle de la réponse cytotoxique au virus HTLV-1 a naturellement orienté l'effort de recherche vers l'étude de la réponse adaptative, l'influence de la réponse innée a été étudiée plus tardivement. Les études ont rapidement porté sur l'interféron de type I (IFN-I, regroupant IFN- α et IFN- β), signal produit suite à la détection de pathogènes et déclenchant une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de gènes spécifiques (ISG, pour *Interferon-Stimulated Genes*). Les facteurs codés par ces gènes sont à l'origine d'un état anti-viral cellulaire, permettant d'inhiber notamment la réplication virale. Cette réponse innée est un médiateur majeur de la réponse immunitaire anti-virale, largement ciblé par les facteurs viraux et fréquemment utilisé en thé-

rapie.

Les études sur la question ont rapidement rapporté un effet inhibiteur du traitement par l'IFN- α sur le cycle viral de HTLV-1, qui cible particulièrement l'assemblage des particules virales [Feng et al., 2003]. Cet effet est à mettre en lien avec l'utilisation de l'interféron en thérapie couplée à l'inhibiteur de transcriptase inverse Zidovudine. L'utilisation de cette thérapie en première intention a montré des effets bénéfiques sauf pour les cas de lymphomes [Bazarbachi et al., 2010].

Sur le plan mécanistique, l'effet de l'IFN-I sur l'infection HTLV-1 présente un effet dual. En cohérence avec les résultats cliniques, il a été montré que l'IFN-I permettait d'obtenir un effet globalement inhibiteur sur l'infection *de novo* de lymphocytes *in vitro*, et ce par l'intermédiaire de l'activation de l'ISG PKR (pour *Protein Kinase R*) [Cachat et al., 2013]. L'étude plus précise des interactions entre l'IFN-I et le virus ont montré l'existence de mécanismes d'échappement aux effets de l'IFN-I, notamment par la répression de l'activation de PKR par un autre ISG, ADAR (pour *Adenosine Deaminase Acting on RNA*) dont l'expression est augmentée dans les cellules infectées indépendamment de l'IFN-I [Cachat et al., 2014].

b) Interactions entre HTLV-1 et la production d'interféron Les principales cellules productrices d'IFN-I lors de l'infection virale sont les pDC. Il a été montré que les particules virales HTLV-1 sont détectables par les pDC, induisant la production de l'IFN-I [Colisson et al., 2010]. Ces résultats suggèrent que les pDC sont capables de détecter le virus HTLV-1. Chez les patients ATL, une corrélation inverse est observée entre la charge provirale et la production d'IFN-I *ex vivo*, fondée notamment sur une déficience dans la production d'IFN-I concernant spécifiquement les pDC [Hishizawa et al., 2004]. Ces résultats suggèrent que HTLV-1 peut avoir un impact sur la production d'IFN-I par les pDC lors de stimulations postérieures à la primo-infection. Ces données soulèvent l'hypothèse d'un éventuel échappement viral aux voies en amont de la production d'interféron, comme c'est fréquemment le cas pour de nombreux virus. En parallèle, des études se sont penchées sur les interactions entre le virus HTLV-1 et les voies de production d'IFN-I dans les autres types cellulaires. Nous allons maintenant nous intéresser à certaines de ces études, consacrées principalement aux interactions entre HTLV-1 et les facteurs IRF (pour *Interferon Regulatory Factor*), jouant un rôle majeur dans l'induction de la production d'IFN-I.

Le facteur Tax a été décrit dans un premier temps comme un activateur du facteur IRF3 [Suzuki et al., 2010]. Cette activation d'IRF3 serait compensée par un autre mécanisme d'ori-

gine virale indépendant de Tax, passant par l'activation du facteur IRF4 [Suzuki et al., 2010]. Ce modèle semble être battu en brèche par des études récentes qui tendent à démontrer l'effet inhibiteur sur le facteur IRF3, médié par une inhibition Tax-dépendante de la phosphorylation activatrice de IRF3 par la kinase TBK1 (pour *TANK-Binding Kinase 1*), associée à une relocalisation cellulaire de TBK1 [Diani et al., 2015, Yuen et al., 2016]. Chez les porteurs asymptomatiques et les patients HAM/TSP, l'échappement immunitaire inné dans les cellules infectées médié par Tax passe également par l'induction de l'inhibiteur SOCS (pour *Suppressor of Cytokine Signaling 1*), provoquant la dégradation de IRF3 [Olière et al., 2010]. En parallèle, Tax réprime l'ubiquitination du facteur stimulateur de la production d'interféron STING (pour *STimulator of INterferon Genes*) dans les macrophages, ce qui promeut l'échappement immunitaire de HTLV-1 [Wang et al., 2017].

De manière intéressante, de nombreuses études décrivent un effet de HTLV-1 sur les IRF dans les lymphocytes T, avec des conséquences non seulement sur l'échappement immunitaire, mais aussi sur l'oncogenèse. En effet, l'infection par HTLV-1 promeut l'expression du facteur IRF5, effet en partie dû à Tax [Ishikawa et al., 2015]. De manière notable, la surexpression de IRF5 promeut à son tour l'expression de divers facteurs aux effets prolifératifs potentiels, comme le $TNF\alpha$. De même, la relocalisation de TBK1 par Tax que nous évoquions précédemment est associée à une activation des voies prolifératives STAT3 et $NF-\kappa B$ (sur lesquelles nous reviendrons) [Zhang et al., 2016]. Ainsi, les effets d'échappement immunitaire inné et de promotion de la prolifération semblent partager un lien mécanistique direct, l'un pouvant être l'effet secondaire de l'autre.

C.3. Tentative de synthèse : le système immunitaire dans l'issue clinique de l'infection HTLV-1

Les principales synthèses concernant l'influence du système immunitaire sur le devenir de l'infection par HTLV-1 ont été réalisées par le Pr. Mari Kannagi [Kannagi et al., 2011, Kannagi et al., 2012]. Dans ce modèle, les réponses innées et adaptatives jouent le rôle de deux points de contrôle de l'infection HTLV-1. Le constat de l'association de la pathologie ATL à une réponse CTL plus faible que la pathologie HAM/TSP, toutes les deux dans des contextes de charge provirale élevée, est à l'origine de l'hypothèse du rôle de verrou de cette réponse CTL dans l'apparition d'une ATL. Ainsi, les ATL se développeraient lors d'un contrôle insuffisant de la prolifération cellulaire par les CTL. Au contraire, la HAM/TSP correspondrait à des cas où la réponse CTL est plus forte, et où une forte expression virale est permise par des dysfonc-

II. ÉPIDÉMIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE DE L'INFECTION HTLV-1

tionnements importants de l'immunité innée, et particulièrement de la réponse interféron. Ce dysfonctionnement inné anti-viral serait à l'origine de l'inflammation chronique qui caractérise la HAM/TSP, par une boucle amplificatrice de production des cytokines pro-inflammatoires (Figure 1.8). Ce modèle simplifié ne doit évidemment pas occulter l'impact de la réponse CTL sur la production virale, ni celui de la réponse interféron sur la prolifération cellulaire.

En perspective à cette partie consacrée aux réponses immunitaires au virus HTLV-1, notons donc l'importance de l'arsenal immunitaire anti-viral intrinsèque aux cellules, dont les voies induites par l'interféron sont une partie primordiale, mais qui ne saurait s'y résumer. De plus, nous voyons que certaines voies cellulaires sont impliquées à la fois dans les pathologies ATL et HAM/TSP. C'est notamment le cas de l'activation de la voie NF- κ B, voie à la fois pro-inflammatoire et proliférative sur laquelle nous reviendrons dans le détail.

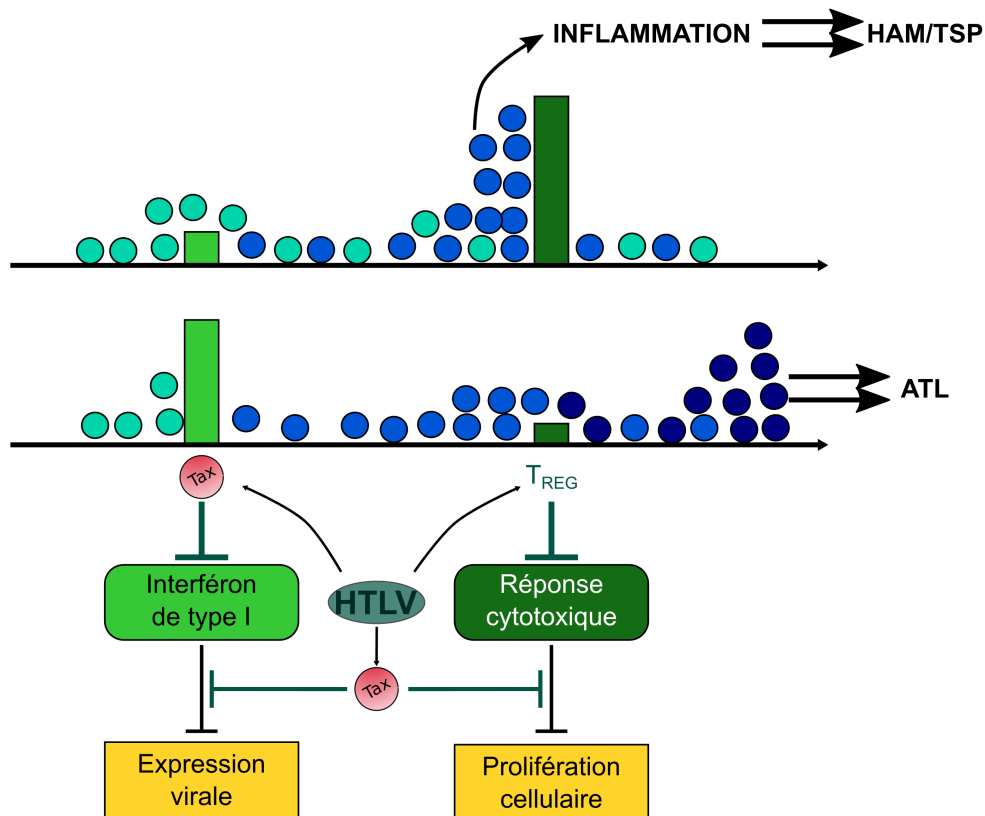


FIGURE 1.8 – Importance de l’immunité dans le devenir clinique de l’infection par HTLV-1

Le système immunitaire constitue deux grands obstacles au virus HTLV-1 : l’inhibition de l’expression virale par l’interféron et l’inhibition de la prolifération cellulaire par la réponse cytotoxique. L’échappement du virus à la réponse interféron permet l’augmentation de l’expression virale, à l’origine d’une potentielle amplification inflammatoire pouvant déboucher sur une pathologie de type HAM/TSP (*partie supérieure*). L’inhibition de la prolifération cellulaire par la réponse adaptative cytotoxique est un frein majeur au développement oncogène menant à l’ATL (*partie inférieure*).

HTLV-1 est capable d’inhiber les voies de production et d’action de l’IFN-I, ainsi que d’inhiber la mise en place d’une réponse cytotoxique en passant notamment par l’induction de cellules régulatrices. L’impact de cette réponse sur le virus HTLV-1 est également réduit, notamment par l’inhibition du CMH-I. L’inhibition de l’expression de Tax, non représentée ici, joue également un rôle dans l’échappement immunitaire des cellules infectées.

Schéma adapté du modèle établi par le Pr. Mari Kannagi [Kannagi et al., 2011, Kannagi et al., 2012]. Les cercles représentent les cellules infectées, avec leur nombre reflétant la prolifération cellulaire et les nuances de couleurs représentant l’apparition de nouveaux clones. Les barres vertes représentent les obstacles immunitaires à l’expansion des cellules infectées, leur hauteur reflétant arbitrairement l’efficacité de chaque obstacle immunitaire.

D. Pathogenèse ATL liée à HTLV-1

D.1. L'ATL : considérations cliniques

L'ATL comprend divers sous-types cliniques, dont la classification établie au début des années 90 est détaillée ci-dessous [Shimoyama, 1991]. Les manifestations de l'ATL comprennent des lymphomes, caractérisés par une prolifération cellulaire au niveau des organes lymphoïdes secondaires sans présence de lymphocytes anormaux dans le sang, ainsi que des leucémies, caractérisées par une prolifération cellulaire touchant généralement les cellules de la moelle osseuse, associée à une présence de lymphocytes anormaux dans la circulation sanguine. Toutefois il est à noter que des études ont montrée une absence de détection de l'ADN viral d'HTLV dans les progéniteurs la moelle osseuse, suggérant que la moelle osseuse n'est pas systématiquement touchée [Nagafuji et al., 1993].

1. Le type lancinant, appelé classiquement indolent est caractérisé par un nombre normal de lymphocytes mais avec plus de 5 % de lymphocytes anormaux.
2. Le type chronique est caractérisé par une lymphocytose marquée comptant plus de 5 % de lymphocytes T anormaux, comprenant parfois des cellules en fleurs. Ce type peut être associé à des lymphadénopathies, spléno- ou hépato-mégalies ou encore des lésions cutanées.
3. Le type lymphomateux est caractérisé par une lymphadénopathie clairement établie sans pour autant présenter de lymphocytose, avec moins d'1 % de lymphocytes anormaux dans le sang.
4. Le type aigu, regroupant les autres patients, présente généralement à la fois des signes leucémiques clairs et des lésions tumorales, comme des lymphadénopathies et des lésions extranodales.

Concernant le pronostic des patients sans traitement, la médiane de survie est estimée à plus de cinq ans pour les cas indolents, environ deux ans pour les cas chroniques, un peu moins d'un an pour les cas lymphomateux et six mois pour les cas aigus.

Il n'existe à ce jour aucun traitement permettant la guérison complète de l'ATL. En plus des chimiothérapies classiques de type CHOP (Cyclophosphamide, Hydaunorubicine, Oncovin et Prednisone), des thérapies antivirales à base de Zidovudine et d'interféron- α sont testées, avec de bons résultats en première intention, à l'exception des cas lymphomateux [Bazarbachi et al., 2010]. D'autres thérapies sont à l'essai, comme la tri-thérapie Arsenic - interféron- α -

Zidovudine, les allo-greffes de cellules souches hématopoïétiques, ou encore l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre CD25 ou CCR4, ouvrant de nouvelles perspectives [Nasr et al., 2017].

D.2. Oncogenèse et expansion clonale de HTLV-1

Comme nous l'avons évoqué plus tôt, le virus HTLV-1 est capable d'induire la transformation des cellules infectées. Nous l'avons ré-explicité, le contrôle immunitaire est le principal obstacle existant entre cette transformation et la poursuite du processus oncogène. L'infection virale est à l'origine d'une inhibition de l'apoptose et d'une promotion du cycle cellulaire, qui aboutissent à la prolifération des cellules infectées et à la survenue d'une expansion clonale. Ces cellules peuvent ensuite acquérir un phénotype immortalisé par l'abolition de la sénescence au sens large, puis un phénotype transformé par l'acquisition d'une indépendance vis-à-vis de l'IL-2 exogène. La contribution des clones à la charge provirale est prépondérante, les événements de néo-infection cellulaire étant minoritaires.

Il a été montré très tôt que les patients développant une ATL présentent un profil d'intégration mono- ou oligo-clonal [Yoshida et al., 1984]. Le développement de techniques de séquençage permettant d'étudier plus finement cette clonalité a ensuite débuté, confirmant que 80 % des cas d'ATL se caractérisent par un profil monoclonal, le clone majoritaire représentant plus de 95 % de la charge provirale [Cook et al., 2014]. Pour l'heure, malgré la définition de divers profils de clonalité au sein des patients ATL, aucun caractère prédictif n'a été associé aux paramètres de clonalité [Cook et al., 2014]. Assez logiquement, le suivi de la clonalité au cours de la phase asymptomatique démontre que le clone prolifératif majoritaire émerge généralement tard à partir d'un clone quelconque, qui prend le pas sur les autres au moment de la déclaration de l'ATL.

Nous allons maintenant nous pencher sur le mécanisme de la transformation cellulaire à l'origine de cette oncogenèse, en nous intéressant principalement au rôle de Tax.

III Le rôle du transactivateur Tax dans la transformation cellulaire

A. Tax, le couteau suisse de HTLV-1

Le facteur viral Tax est une protéine de 353 acides aminés dont la structure tridimensionnelle demeure toujours inconnue. Parmi les domaines structuraux connus à ce jour, Tax possède un motif en doigt à Zinc jouant le rôle de séquence de localisation nucléaire (*Nuclear Localization Signal*, NLS) ainsi que deux régions en *leucine zipper* délimitant la zone fonctionnelle considérée comme importante pour l'activation de la voie NF- κ B (régions 116–145 et 213–248). Tax possède, en plus du signal de localisation nucléaire, un signal d'export nucléaire (*Nuclear Export Signal*, NES), ainsi qu'une zone de contact avec l'ADN.

Plusieurs domaines fonctionnels ont été déterminés. On trouve notamment deux vastes domaines liés à l'activation du facteur CREB et un domaine lié à l'activation de la voie NF- κ B (Figure 1.9). Parmi les très nombreux domaines d'interaction avec divers partenaires sur lesquels nous reviendrons, la présence à l'extrémité carboxy-terminale d'un motif de liaison aux domaines PDZ (pour *Post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, and *Zonula occludens-1 protein (zo-1)*), appelé PBM (pour *PDZ-Binding Motif*, PBM) est notable.

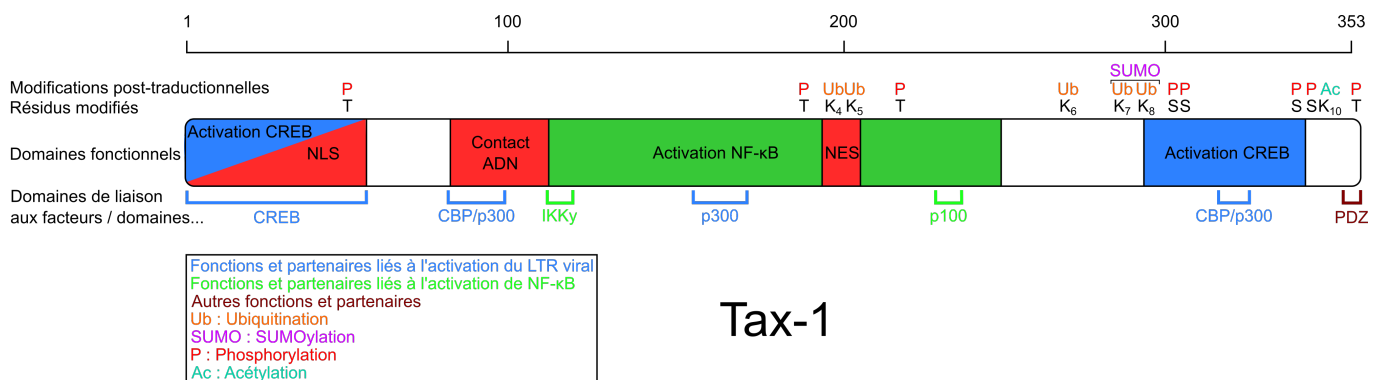


FIGURE 1.9 – Principaux domaines fonctionnels de Tax-1

Les domaines fonctionnels liés à l'activation du LTR viral (en bleu) et à l'activation de la voie NF- κ B (en vert) sont représentés, ainsi que les zones de contact à l'ADN et d'import-export nucléaire. Les modifications post-traductionnelles sont représentées au-dessus avec l'acide aminé concerné.

Inspiré de [Romanelli et al., 2013]

A.1. Interactome de Tax

a) Les nombreux partenaires de Tax L'une des caractéristiques frappantes de Tax est le grand nombre de partenaires cellulaires qui lui sont attribués [Boxus et al., 2008, Simonis et al., 2012]. De nouveaux partenaires sont décrits au cours du temps, et le compte des interactions présumées s'élève à plus d'une centaine. Il faut toutefois prendre garde à distinguer les interactions caractérisées biochimiquement en contexte cellulaire des interactions présomptives obtenues en criblage double-hybride en levure, qui comportent potentiellement un certain nombre d'interactions qui ne seront pas confirmées.

L'interactome de Tax nous permet de nous faire une première idée sur l'étendue des fonctions touchées par ce facteur. Sans tenter d'être exhaustif, et en se concentrant principalement sur des facteurs que nous reverrons plus en détail dans cette partie, nous pouvons citer des fonctions de régulation transcriptionnelle génétique et épigénétique (facteurs CREB, CBP/p300), de régulation de l'intégrité génétique (facteurs CHK1/2), de régulation du cycle cellulaire (facteurs CDK - *Cyclin-Dependent Kinase* et CKI - *CDK-Inhibitors*), de régulation post-traductionnelle (l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine E2 Ubc13), ainsi que des effecteurs de diverses voies de signalisation (IKK γ de la voie NF- κ B et PI3K - *PhosphoInositide 3-Kinase* de la voie Akt).

Le motif PBM permet d'établir des interactions avec les protéines possédant un domaine PDZ. Ce domaine est d'intérêt dans l'étude de la transformation cellulaire par Tax car il est présenté par la protéine Tax1, mais pas par la protéine Tax2, codées respectivement par les virus HTLV-1 et HTLV-2, ce dernier n'étant pas oncogène [Higuchi and Fujii, 2009]. L'importance du PBM pour la transformation médiée par Tax a été démontrée *in vitro* sur des cellules de rat [Hirata et al., 2004]. Par ce domaine, Tax interagit notamment avec les suppresseurs de tumeur MAGI-1 et Scribble, ainsi qu'avec Dlg1, sur lequel nous reviendrons [Makokha et al., 2013, Okajima et al., 2008, Ishioka et al., 2006]. Le PBM semble également impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax [Higuchi et al., 2007].

b) Paramètres intervenant dans les interactions de Tax L'impressionnante liste de partenaires de Tax soulève la question des bases biochimiques soutenant toutes ces interactions. C'est l'occasion de s'intéresser de plus près à certaines caractéristiques de Tax qui sont à même de moduler ses interactions avec les partenaires cellulaires, notamment sa localisation sub-cellulaire et les modifications post-traductionnelles dont elle fait l'objet.

La localisation sub-cellulaire de Tax est très diverse. On compte classiquement trois grands profils de localisation au niveau de la cellule : des cellules où Tax est exclusivement nucléaire,

III. RÔLE DE TAX DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

des cellules où Tax est exclusivement péri-nucléaire (cytoplasmique) et des cellules contenant les deux formes de Tax. D'après les études disponibles, la proportion de chaque cas dépend du type cellulaire. Par exemple, la lignée infectée par HTLV-1 SLB-1 présente 80 % de cellules où le marquage Tax est exclusivement nucléaire, là où la lignée Hut-102 présente 25 % de Tax nucléaire [Slamon et al., 1985, Kiyokawa et al., 1985]. Dans le noyau, Tax forme des foyers nucléaires, ou *Nuclear Speckles*, dont les fonctions sont débattues. La région où Tax cytosolique est localisé a été décrite avec quelques variations selon les études, mais peut être globalement définie comme la zone englobant l'appareil de golgi et le centrosome, deux organites dont les interactions sont connues [Harhaj et al., 2007, Kfoury et al., 2008, Lamsoul et al., 2005, Nasr et al., 2006, Journo et al., 2009]. Cette fraction cytosolique de Tax est largement décrite comme associée aux raideaux lipidiques, avec des conséquences fonctionnelles sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir [Huang et al., 2009, Pujari et al., 2015]. Dans chacune de ces sous-localisations, Tax est susceptible d'interagir avec des partenaires différents.

Tax est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles [Shirinian et al., 2013] (Figure 1.9). En premier lieu, Tax comporte dix résidus lysine donc cinq (K4 à K8) sont connus comme cibles d'ubiquitination, et deux (K7 et K9) comme cibles de SUMOylation (SUMO, pour *Small Ubiquitin-like MOdifier*), ce qui conditionne notamment la localisation sub-cellulaire de Tax, les formes ubiquitinées étant plutôt cytosoliques et les formes SUMOylées nucléaires [Lamsoul et al., 2005, Nasr et al., 2006]. L'ubiquitination de Tax est un modulateur crucial dans l'activation de la voie NF- κ B, comme nous aurons l'occasion de le voir plus en détail ultérieurement. Le dernier résidu lysine de Tax (K10), situé au niveau du PBM, est quant à lui décrit comme une cible d'acétylation, ce qui aurait un rôle dans les étapes nucléaires d'activation de la voie NF- κ B [Lodewick et al., 2009].

Tax peut également être phosphorylé [Bex et al., 1999]. Au moins huit résidus de Tax sont susceptibles d'être phosphorylés [Kfoury et al., 2012]. Il s'agit des Thr-48, Thr-184, Thr-215, Ser-300, Ser-301, Ser-336, Ser-344 et Thr-351. La phosphorylation de plusieurs résidus semble être un pré-requis à d'autres modifications, comme l'acétylation ou la SUMOylation [Lodewick et al., 2009]. En outre, la phosphorylation des résidus Ser-300 et Ser-301 est nécessaire pour la localisation de Tax dans les *nuclear speckles* [Bex et al., 1999]. La phosphorylation des résidus Ser-336, Ser-344 et Thr-351 pourrait être impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B médiée par le PBM de Tax [Higuchi et al., 2007, Bidoia et al., 2010].

A.2. Fonctions transactivatrices de Tax

a) Effet transactivateur du génome proviral Tax est défini en premier lieu comme le transactivateur du virus HTLV-1. En cela, il est responsable de l'activation de l'expression à partir du LTR 5'. Cette activation transcriptionnelle se fait par reconnaissance indirecte, par la protéine Tax, de séquences spécifiques, les TxRE (pour *Tax Responsive Elements*). Ces séquences sont composées de trois sous-domaines dont le domaine central contient un élément CRE (pour *CREB Response Element*) [Giam and Xu, 1989]. Ainsi, l'interaction de Tax avec les facteurs CREB permet sa fixation au niveau des séquences TxRE.

Une fois Tax fixé au TxRE, de nombreux facteurs comme CBP/p300 (pour *CREB Binding Protein*), pCAF (pour *p300/CBP-Associated Factor*) et TORC (pour *Target of Rapamycin Complex*) sont recrutés [Harrod et al., 1998, Siu et al., 2006]. CBP/p300 est un facteur majeur de remodelage de la chromatine, et Tax interagit avec d'autres facteurs de ce remodelage, comme SWI/SNF (pour *Switch/Sucrose Non Fermentable*). Tous ces événements sont à l'origine de remaniements de l'environnement chromatinien autour du LTR, résultant en une augmentation de son activité transcriptionnelle [Easley et al., 2010].

Une fois la chromatine accessible, les facteurs de transcription sont recrutés au niveau de la boîte TATA au niveau du LTR. Tax fixe ensuite le facteur TBP (pour *TATA-Binding Protein*), ce qui a pour effet de le stabiliser sur la boîte TATA [Caron et al., 1993]. Tax est ensuite capable de promouvoir le recrutement du facteur PTEF (pour *Positive Transcription Elongation Factor*), participant à la promotion de l'élongation de la transcription [Cho et al., 2007] (Figure 1.10).

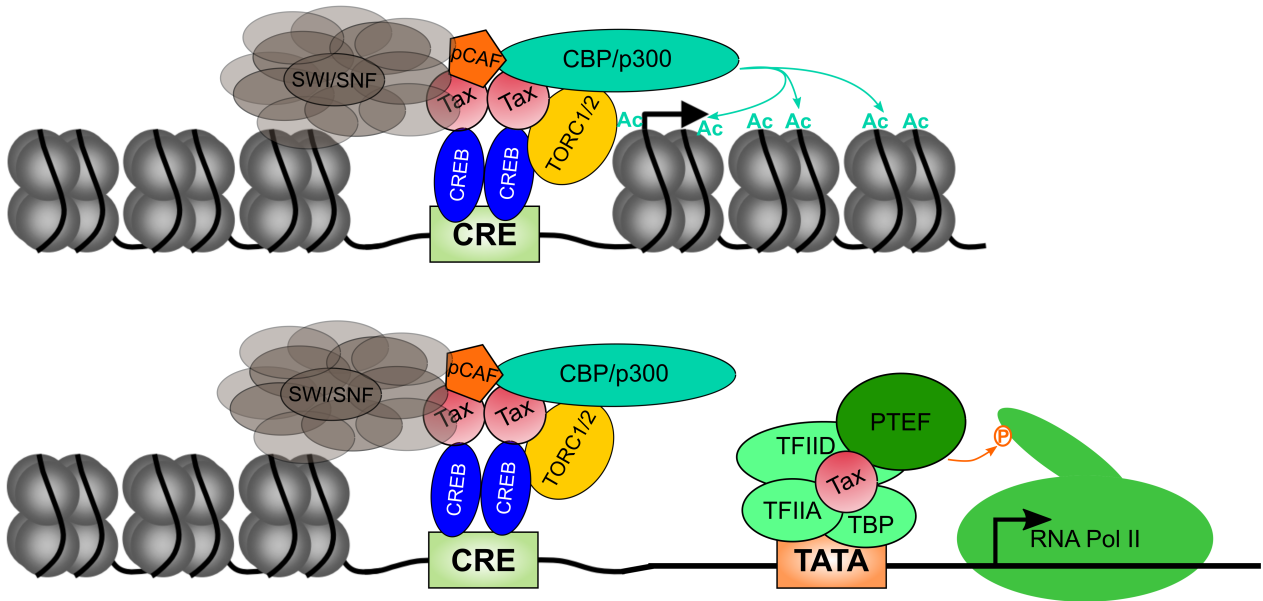


FIGURE 1.10 – Effets transactivateurs de Tax sur le génome proviral

L'activation du LTR viral par Tax met en jeu de nombreuses interactions fonctionnelles, aboutissant à des modifications épigénétiques (partie du haut). Après fixation sur les séquences du LTR 5', Tax recrute les régulateurs épigénétiques pCAF et CBP/p300, ce qui conduit à l'acétylation (Ac) des histones. D'autres facteurs de remodelage chromatinien sont recrutés, comme SWI/SNF.

Tax promeut également la transcription directement en se fixant au facteur TBP, recrutant le facteur d'élongation PTEF qui phosphoryle la queue carboxy-terminale de l'ARN polymérase II (partie du bas).

Adapté de [Boxus et al., 2008]

b) Effets transactivateurs sur des gènes cellulaires L'activité transactivatrice de Tax ne se limite pas aux gènes viraux, mais concerne également un grand nombre de gènes cellulaires. Notamment, Tax promeut par ce biais l'expression des facteurs GEM (*GTP-binding protein GEM*) et ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), impliqués respectivement dans le remodelage du cytosquelette et les interaction inter-cellulaires, ce qui a pour effet de promouvoir notamment la transmission de cellule à cellule [Chevalier et al., 2014, Tanaka et al., 1996]. Dans le cas de l'expression de ICAM-1, il est notable que cette activation résulte de la combinaison d'un effet direct de Tax sur le promoteur, ainsi que de l'effet des facteurs NF- κ B [Tanaka et al., 1996].

De nombreux effets transactivateurs de Tax sur des gènes cellulaires sont en lien avec la capacité de transformation de Tax, comme nous le verrons ultérieurement.

A.3. Fonctions transformantes de Tax

En parallèle de sa fonction transactivatrice, Tax est également l'une des oncoprotéines portées par le virus HTLV-1. L'importance de Tax pour la mise en place de la transformation cellulaire a été démontrée rapidement, tout d'abord avec des tests de formation de colonies en agar mou, puis des essais d'immortalisation de lymphocytes primaires humains [Tanaka et al., 1990, Grassmann et al., 1992]. L'établissement d'un clone moléculaire du virus HTLV-1 a ensuite permis de déterminer les facteurs importants pour la transformation, ce qui a permis de mettre en évidence que les facteurs auxiliaires p12, p13 et p30 étaient dispensables pour la transformation, mettant en lumière le rôle de Tax et HBZ [Robek et al., 1998]. Cette importance de Tax a plus tard été confirmée en modèle animal, avec le développement de leucémies dans un modèle murin transgénique exprimant Tax au niveau des cellules de la lignée lymphoïde T [Hasegawa et al., 2006]. Plus récemment, une étude basée sur l'infection de cellules sanguines de donneurs sains par un lentivecteur d'expression de Tax a montré que les capacités d'immortalisation et de transformation propres à Tax sont faibles [Bellon et al., 2010]. Ces données suggèrent fortement que Tax n'est pas suffisant pour obtenir une transformation, et que la présence d'autres facteurs viraux est donc importante pour l'oncogenèse.

Au fil des études, il a été montré que Tax était à l'origine d'une induction multi-latérale de la transformation cellulaire dans les cellules infectées. Nous allons maintenant voir en détail les principaux effets transformants de Tax sur la physiologie cellulaire.

B. L'induction multi-latérale de la transformation cellulaire médiée par Tax

B.1. Tax et dérégulation du cycle cellulaire

a) Régulation du cycle cellulaire La régulation du cycle cellulaire est un ensemble de mécanismes complexes déterminant la réplication génétique, la mitose et éventuellement la capacité d'une cellule à entrer en différenciation. Le cycle cellulaire est régulé par des facteurs exogènes (micro-environnement, messages reçus) et endogènes (*checkpoints* assurant le bon déroulement des étapes du cycle). Trois familles principales gouvernent ce cycle : les cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (*CDK*), ainsi que les inhibiteurs de CDK (ou *CKI*) [Lim and Kaldis, 2013].

Parmi toutes les transitions de phases du cycle, deux sont particulièrement régulées. Il s'agit

III. RÔLE DE TAX DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

de la transition G1/S, responsable de l'entrée en réplication, et de la transition G2/M, responsable de l'entrée en mitose. La transition G1/S est sous le contrôle notamment des couples CyclineD/CDK4/6. L'une de ces actions passe par la phosphorylation du facteur Rétinoblastome (ou *Rb*), induisant sa dissociation d'avec le facteur de transcription E2F, qui peut ainsi transloquer jusqu'au noyau et transactiver les gènes nécessaires au passage en phase S. La transition G2/M, quant à elle, est sous le contrôle notamment du couple CyclineB/CDK1, responsable notamment de la phosphorylation activatrice du facteur de transcription FoxM1, transactivateur des gènes nécessaires au passage en phase M [Lim and Kaldis, 2013].

Comme nous avons déjà eu l'occasion de le noter, les différentes étapes de régulation du cycle cellulaire, et notamment les *checkpoints*, sont des cibles récurrentes de nombreux virus, qu'ils soient oncogènes ou non [Chaurushiya and Weitzman, 2009].

b) **Accélération du cycle cellulaire par Tax** De manière peu surprenante, les effets de Tax sur le cycle cellulaire sont très majoritairement orientés vers l'accélération de celui-ci, en cohérence avec les effets oncogènes de ce facteur. Tax interfère avec un grand nombre d'éléments régulateurs du cycle cellulaire, que ce soit par le biais d'interactions directes suivies de modifications protéiques, ou par le biais d'effets transcriptionnels (Figure 1.11).

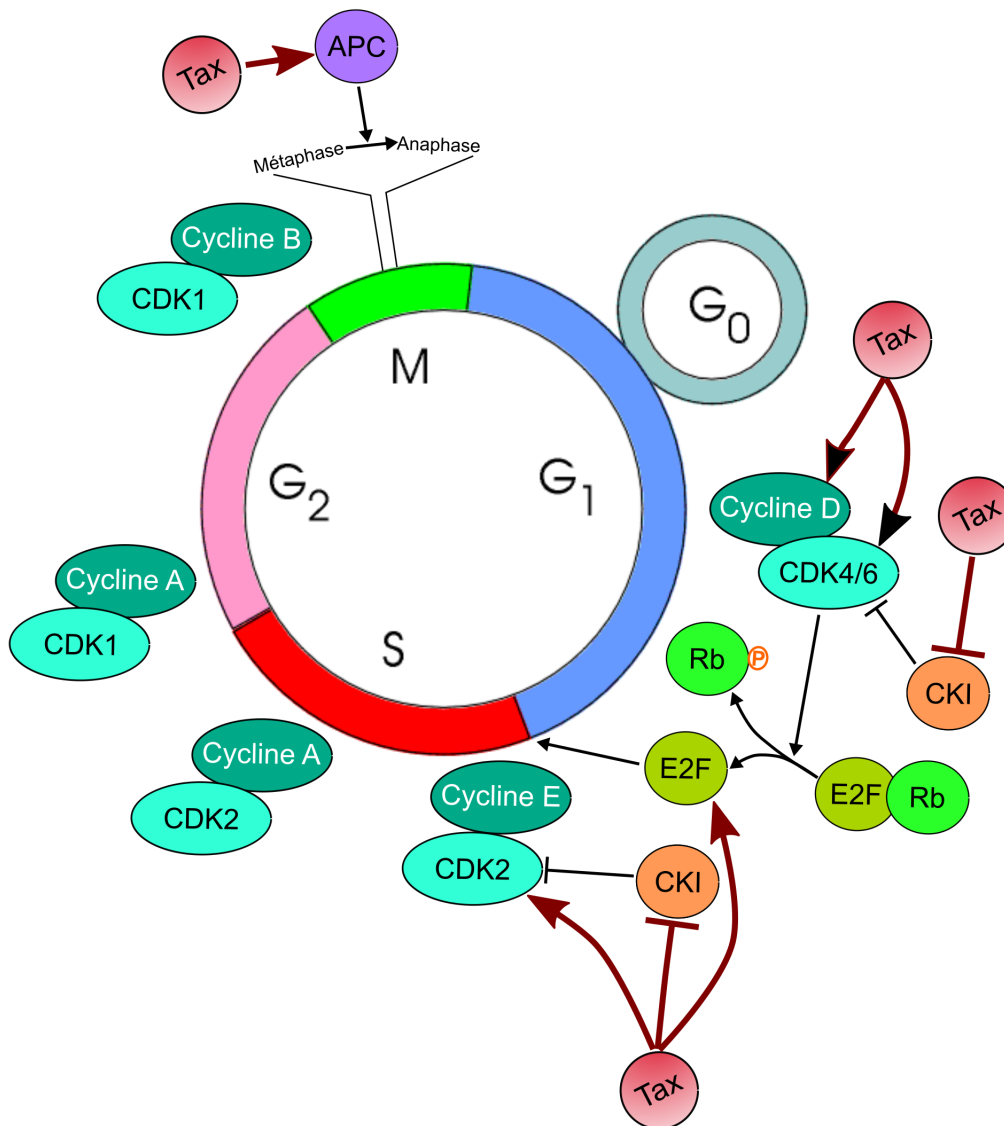


FIGURE 1.11 – Effets de Tax sur le cycle cellulaire

Tax promeut l'activation du cycle cellulaire au niveau des deux principaux points de contrôle de ce cycle : les transitions G₁/S et le contrôle de la mitose. La transition G₁/S est une étape particulièrement dérégulée par Tax, et cette représentation a le mérite d'illustrer que presque toutes les étapes de cette régulation sont touchées, directement, ou transcriptionnellement par Tax.

Illustration du cycle empruntée au site accs.ens-lyon.fr

III. RÔLE DE TAX DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Ainsi, Tax est capable de lier, par l'intermédiaire de NF- κ B, les promoteurs des gènes codant la CyclineD2 et le facteur CDK6, impliqués dans la promotion de la transition G1/S [Santiago et al., 1999, Iwanaga et al., 2008]. Tax interagit également de manière directe avec CDK4, induisant ainsi une hyper-phosphorylation de la protéine Rb [Haller et al., 2002, Fraedrich et al., 2005]. L'activation des CDK est amplifiée par la capacité de Tax à réprimer l'expression des CKI p19^{INK4D} et p27^{KIP1}, de façon dépendante de la voie NF- κ B [Iwanaga et al., 2001]. Enfin, il a également été montré que Tax active l'expression du facteur de transcription E2F1 [Lemasson et al., 1998]. Par cet exemple, nous pouvons voir que Tax est capable de moduler l'expression et l'activité de la plupart des facteurs régulateurs de la transition G1/S.

Tax est également capable de promouvoir certaines phases du cycle cellulaire en agissant directement sur les effecteurs du cycle, situés en aval du contrôle des Cyclines et CDK. C'est notamment le cas de l'anaphase, dont Tax peut promouvoir la survenue en activant le complexe formé par les facteurs APC (pour *Anaphase Promoting Factor*) et Cdc20, notamment responsable du *checkpoint* d'attachement du fuseau mitotique [Liu et al., 2005]. Cette activation est médiée par une interaction directe, et provoque un déclenchement précoce de l'anaphase.

c) Tax et cycle cellulaire : une relation complexe De nombreuses interactions fonctionnelles entre Tax et divers régulateurs du cycle cellulaire ont été décrites, agissant sur diverses étapes de contrôle du cycle. Mais parmi ces interactions fonctionnelles, certaines résultent en un ralentissement, voire un arrêt du cycle cellulaire.

Des cas d'arrêt du cycle en phase G0/G1 ont en effet été rapportés, dans des cellules exprimant Tax ou des progéniteurs hématopoïétiques infectés par HTLV-1 [Liu et al., 2008, Tripp et al., 2005, Banerjee et al., 2008]. Ces résultats suggèrent que l'effet de Tax sur la prolifération cellulaire ne se joue pas complètement des CKI. Cette idée est cohérente avec le fait que des délétions des gènes codant p15^{INK4A} et p16^{INK4B} constituent des facteurs pronostics de la transition vers les ATL aiguës [Hatta et al., 1995].

B.2. Tax et dérégulation de la ploïdie

a) L'aneuploïdie dans les cellules cancéreuses L'aneuploïdie désigne la présence d'un caryotype anormal, notamment en terme de nombre de chromosomes au sein d'une cellule. Cette anomalie constitue une caractéristique générale des cellules cancéreuses [Danielsen et al., 2015]. En particulier, on note une proportion importante de lymphocytes aneuploïdes chez les patients atteints d'ATL [Nitta et al., 2006].

Cette anomalie est à l'origine d'un certain nombre de dysfonctionnements de la physiologie cellulaire. Ces dysfonctionnements sont causés notamment par l'absence de certains chromosomes et à la présence de chromosomes surnuméraires, provoquant d'importantes variations du taux d'expression des gènes qu'ils portent. L'aneuploïdie provoque également des anomalies de réplication de l'ADN et de condensation de la chromatine, avec d'importants effets sur le transcriptome cellulaire [Nicholson and Cimini, 2015].

L'aneuploïdie résulte principalement d'un défaut de ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase mitotique, au cours de laquelle un ou plusieurs chromosomes présentent un retard dans la migration polaire. La survenue de ces *lagging chromosomes* est généralement associée à un défaut de fixation du fuseau mitotique aux kinétochores. Si l'anaphase s'enclenche avant la résolution de ces mésappariements, la migration de ces chromosomes sera anormale, et ils seront séquestrés après cytodierèse dans la cellule correspondant au centrosome le plus proche [Bakhoun et al., 2014] (Figure 1.12).

Sur le plan mécanistique, donc, ces *lagging chromosomes* surviennent particulièrement lors d'un déclenchement précoce de l'anaphase. D'autres facteurs promeuvent l'aneuploïdie, comme par exemple un nombre anormalement élevé de centrosomes, induisant une mitose multipolaire.

b) Promotion de l'aneuploïdie par Tax Comme nous l'avons déjà évoqué, Tax induit un déclenchement précoce de l'anaphase en interférant avec le complexe APC/Cdc20 [Liu et al., 2005]. En sus, Tax est capable de lier et d'interférer avec les fonctions du facteur MAD1 [Jin et al., 1998], facteur régulateur du *checkpoint* d'assemblage du fuseau mitotique agissant en amont du facteur APC. Le déclenchement précoce de l'anaphase ainsi induit, au mépris d'une mise en place correcte du fuseau mitotique, est à l'origine de défauts de ségrégation chromosomique et d'aneuploïdie (Figure 1.12) .

Tax interfère également avec les centrosomes. De façon notable, les patients ATL présentent un nombre très élevé de lymphocytes possédant des centrosomes surnuméraires [Nitta et al., 2006]. Les centrosomes sont dupliqués lors de la phase S et cette duplication constitue un *checkpoint* de l'entrée en phase M. L'amplification des centrosomes survient à la suite d'événements supplémentaires de duplication des centrosomes. Cette duplication est sous le contrôle du facteur CDK2, or nous avons vu que les CDK étaient régulées positivement par Tax au travers de son inhibition globale de la fonction des CKI [Iwanaga et al., 2001, Kehn et al., 2004]. Il a également été montré que Tax pouvait inhiber son partenaire TAX1BP2 dont l'une des fonctions est de réguler la duplication des centrosomes [Ching et al., 2006]. Tax interagit également

III. RÔLE DE TAX DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

avec le facteur RanBP-1, connu pour promouvoir l'amplification centrosomale et la survenue de mitose multipolaires. Cette interaction fonctionnelle semble faire intervenir la voie NF- κ B [Peloponese et al., 2005]. Tax interagit également avec d'autres facteurs centrosomaux, dont la protéine Cep63 (pour *Centrosomal Protein 63 kDa*) [Simonis et al., 2012, Martin et al., 2015].

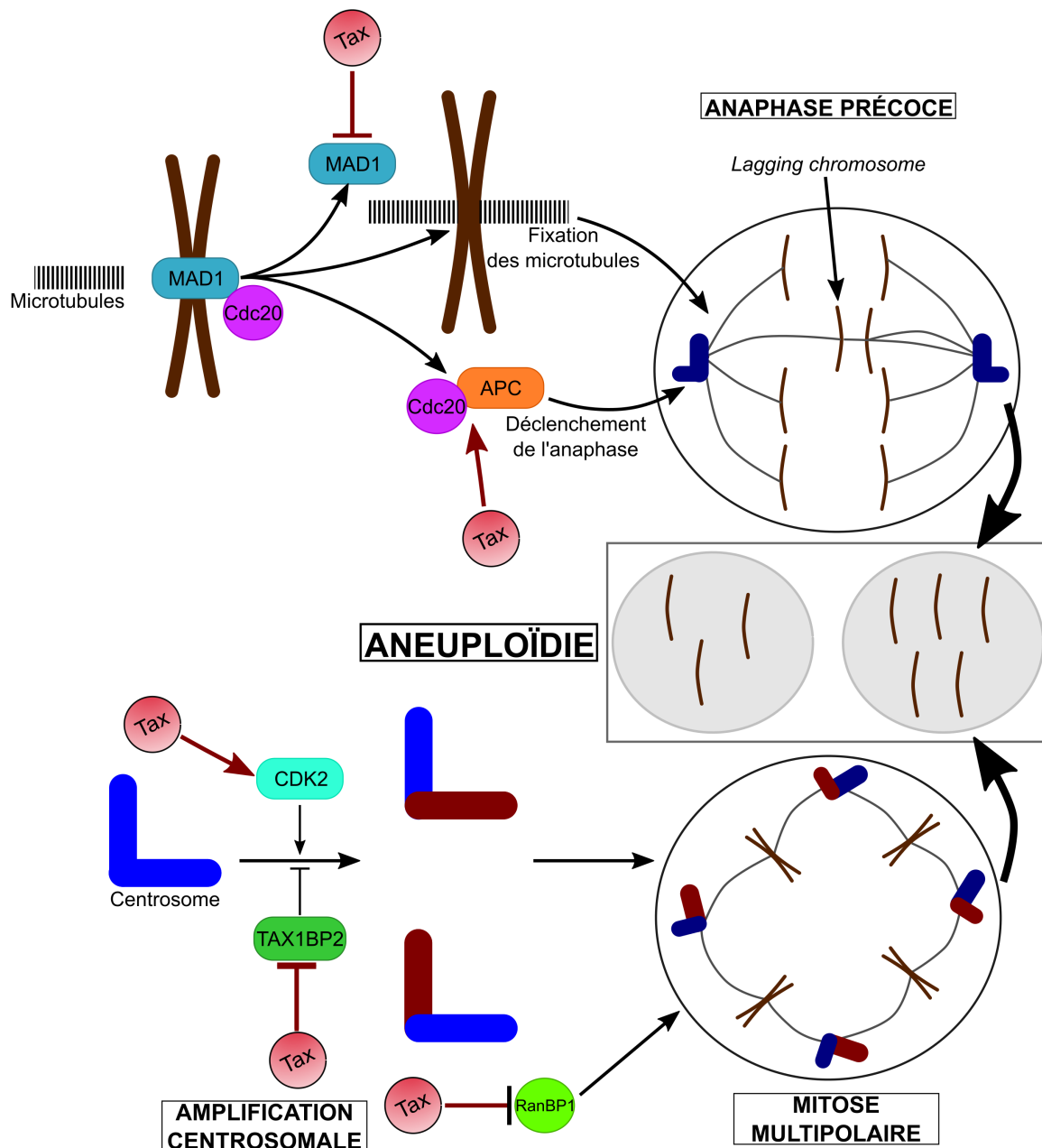


FIGURE 1.12 – Effets de Tax sur la promotion de l’aneuploïdie

Tax promeut l’aneuploïdie de deux façons principales : par l’induction d’anaphases précoces et par l’induction de mitoses multipolaires. Ces deux mécanismes sont liés à l’accélération du cycle cellulaire. En effet, l’accélération du cycle cellulaire médié notamment par l’activation des facteurs APC et CDK1 provoque le court-circuit des *checkpoints* responsables de la bonne mise en place du fuseau mitotique. En parallèle, Tax interagit avec d’autres facteurs, plus spécifiques, comme TAX1BP2 et RanBP1. Ces interactions amplifient la survenue de mitoses multipolaires.

Inspiré de [Nicholson and Cimini, 2015]

B.3. Tax et dommages à l'ADN

L'accumulation de mutations est une caractéristique partagée par l'immense majorité des cellules cancéreuses. En effet, l'accélération du cycle cellulaire augmente la fréquence répliquative et donc l'espérance d'apparition de mutations, et l'aneuploïdie est un inducteur d'instabilité génétique et épigénétique. Mais Tax est également capable d'induire directement des dommages à l'ADN en stimulant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species*, ROS) [Kinjo et al., 2010]. Or, de nombreux mécanismes cellulaires de réparation des dommages à l'ADN existent, permettant théoriquement de limiter l'impact de ces défauts physiologiques. Nous allons voir comment Tax provoque une altération généralisée des mécanismes de réparation de l'ADN.

a) Principaux mécanismes de réparation de l'ADN et leurs voies d'induction Il existe plusieurs systèmes de réparation des dommages à l'ADN. Les principaux sont l'excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*, NER) et l'excision de base azotée (*Base Excision Repair*, BER) permettant de réparer principalement des modifications de base provoquant ou non des modifications de la structure locale de la double hélice d'ADN, ainsi que le rabouillage homologue (recombinaison homologue) ou non (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) de l'ADN ayant subi des cassures double-brin (*Double Strand Break*, DSB) [Iyama and Wilson, 2013].

L'induction de ces différents systèmes de réparation est gouvernée par une somme de voies interagissant de manière complexe. Il est toutefois possible de proposer une synthèse, considérant principalement deux voies d'induction : une voie de réponse aux DSB et une voie de réponse au *stress répliquatif*, englobant toutes les anomalies liées aux erreurs de réplication, aux rayonnements ultra-violetts ainsi qu'à certains agents chimiques comme l'hydroxyurée.

La voie de réponse aux DSB passe par une cascade de signalisation initiée par la phosphorylation du facteur ATM (pour *Ataxia Telangiectasia Mutated*) par le complexe MRN comprenant les facteurs MRE11 (*Meiotic REcombination-11*), RAD50 et NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome-1*) au niveau des DSB. Cette cascade aboutit à la phosphorylation du suppresseur de tumeur p53, capable d'induire les différentes voies de réparation, mais aussi l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose [Sengupta and Harris, 2005] (Figure 1.13).

La voie de réponse aux autres dommages à l'ADN, regroupés sous le terme de *stress répliquatif* passe également par l'activation de p53 au terme d'une cascade initiée par le facteur RAD17, recruté au niveau de la fourche de réplication [Sengupta and Harris, 2005] (Figure 1.13).

b) Inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN par Tax Tax est capable d'inhiber directement différents mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, Tax est capable d'inhiber le mécanisme NER par l'activation transcriptionnelle du facteur PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), augmentant la processivité de la polymérase et donc la vitesse de répliation, ce qui inhibe la réparation [Kao and Marriott, 1999]. Le système de réparation BER, médié principalement par la polymérase β , est également réprimé par Tax, qui inhibe l'expression de cette polymérase [Jeang et al., 1990]. Enfin, Tax inhibe le système NHEJ par inhibition transcriptionnelle du facteur Ku80, indispensable au rapprochement des brins d'ADN séparés après DSB [Ducu et al., 2011] (Figure 1.13).

c) Inhibition des voies d'induction de la réparation de l'ADN par Tax En plus de l'inhibition des mécanismes de réparation en eux-mêmes, Tax est également capable d'inhiber largement les voies d'induction de la réparation. En effet, il a été montré que Tax inhibe l'accumulation du facteur ATM au niveau de la coupure double-brin de l'ADN. Cette inhibition met en jeu la séquestration du facteur MDC1 au niveau de certaines zones chromatiniennes, empêchant ainsi le recrutement de MDC1 par l'histone $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, et la boucle d'amplification du recrutement de ATM qui s'en suit [Chandhasin et al., 2008, Belgnaoui et al., 2010]. De plus, Tax est capable d'inhiber à la fois les voies d'induction DSB et de stress réplicatif par l'inhibition des cascades de signalisation gouvernées par les facteurs CHK1 et CHK2 [Park et al., 2004, Gupta et al., 2007] (Figure 1.13). Tax est également un inhibiteur de p53, comme nous le verrons ultérieurement.

La grande diversité des cibles moléculaires permettant une inhibition de la réparation de l'ADN par Tax pose question. L'inhibition directe des mécanismes de réparation devrait être suffisante pour abroger cette réparation, or Tax inhibe également les voies d'induction de la réparation. L'aspect multi-latéral de l'inhibition des voies d'induction de la réparation indique l'importance évolutive de cibler ces voies en plus des mécanismes de réparation. Ce phénomène trouve probablement sa source dans les nombreuses liaisons existant entre les voies d'induction de la réparation et l'induction de l'apoptose [Chlichlia and Khazaie, 2010]. La densité de ces interactions fonctionnelles met en lumière l'importance fondamentale de l'inhibition de l'apoptose et de la promotion de la survie par Tax dans le processus de transformation lié à HTLV-1.

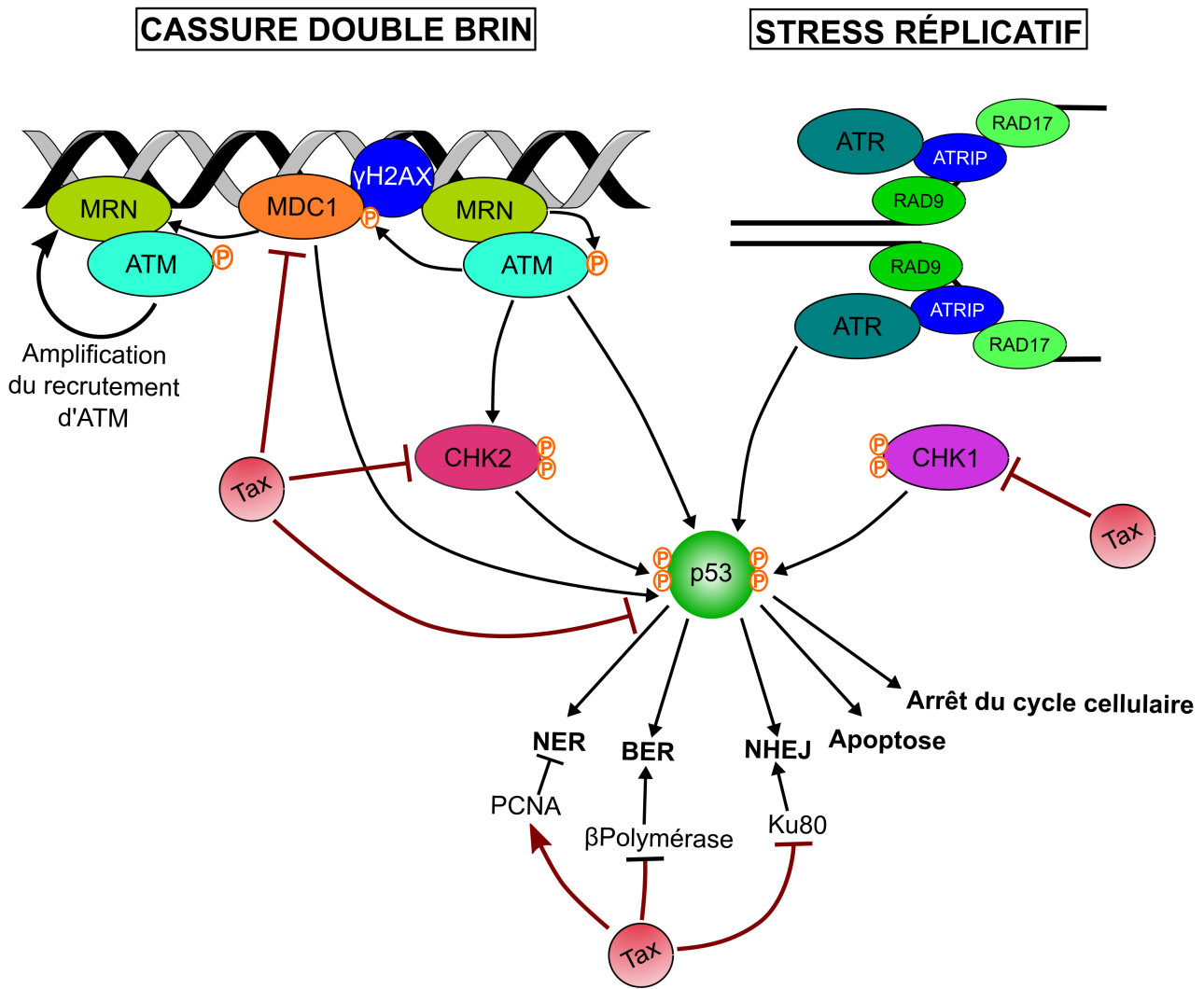


FIGURE 1.13 – Effets de Tax sur les voies de réparation aux dommages à l'ADN

Tax interfère avec les deux grandes voies d'induction de la réparation des dommages à l'ADN : la voie des cassures double-brin (partie gauche) et la voie dite du stress réplcatif (partie droite). Cette interférence repose sur de nombreuses inhibitions concernant plusieurs étapes de ces voies. Tax est également capable d'inhiber directement les principaux mécanismes de réparation de l'ADN (partie basse).

Inspiré de [Sengupta and Harris, 2005]

NB : Les voies ont été simplifiées, occultant notamment le rôle de BRCA1 dans l'activation de CHK2, l'activation de p53 par les complexes initiés par γ H₂AX et 53BP1, ainsi que l'activation directe de la réparation par ATM.

B.4. Tax et promotion de la survie et de la prolifération cellulaire

a) **Inhibition de l'apoptose médiée par p53** Le suppresseur de tumeur p53 est un médiateur crucial de l'apoptose, et sa délétion fonctionnelle est une caractéristique largement partagée par les cellules cancéreuses [Chipuk and Green, 2006]. Dans le cadre de l'infection par le virus HTLV-1, les cellules infectées par le virus présentent une inhibition de l'expression

de p53 [Mahieux et al., 2000b, Mahieux et al., 2000a]. De même, les lymphocytes de modèles murins transgéniques exprimant Tax présentent une diminution de l'expression de p53 [Ohsugi et al., 2013].

Le mode d'inhibition de p53 par Tax ne fait *a priori* intervenir aucune interaction directe, mais est le résultat d'une répression transcriptionnelle du gène codant p53 par Tax. Cette répression implique probablement les facteurs NF- κ B, même si des données récentes obtenues en modèle murin transgénique Tax montrant l'existence d'une inhibition de p53 indépendamment de NF- κ B suggèrent l'existence d'un autre mécanisme [Pise-Masison et al., 2000, Ohsugi et al., 2013].

Comme nous l'avons déjà soulevé précédemment, les modifications médiées par Tax que nous avons décrites précédemment étant connues pour promouvoir la mort cellulaire, l'inhibition des voies apoptotiques, notamment par p53, sont cruciales pour l'aboutissement de la transformation cellulaire [Nicholson and Cimini, 2015].

b) Activation des voies de survie et de prolifération cellulaires Akt et NF- κ B Parallèlement à l'inhibition de la mort cellulaire, Tax est capable de promouvoir les principales voies de survie et de prolifération cellulaire actives dans les lymphocytes T que sont les voies Akt et NF- κ B [Matsuoka and Jeang, 2007].

La voie cellulaire Akt est régulée par phosphorylation du facteur Akt au niveau de la Sérine 473 par la kinase PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*) [Song et al., 2005]. Cette voie passe par l'activation du facteur de transcription AP1 (*Activator Protein 1*), surexprimé dans un grand nombre de cancers, dont les ATL [Jeong et al., 2005]. Tax active la voie Akt en augmentant la phosphorylation du facteur Akt par liaison directe avec la kinase PI3K [Peloponese and Jeang, 2006]. Cette activation semble importante pour le maintien de la survie et de la prolifération des cellules ATL [Ikezoe et al., 2007].

L'activation de la voie NF- κ B par Tax sera décrite de manière plus approfondie ultérieurement. L'activation constitutive de la voie NF- κ B a été décrite très tôt dans les cellules ATL [Mori et al., 1999]. Cette activation passe notamment par l'interaction directe avec le facteur régulateur IKK γ . Toutefois, il est à noter que certaines cellules leucémiques n'exprimant plus Tax présentent toujours une activation constitutive de NF- κ B, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes d'activation [Hironaka et al., 2004].

C. Après les étapes précoces de la transformation cellulaire : quel rôle pour Tax ?

C.1. Perte d'expression de Tax

Tous les éléments que nous venons de lister prouvent sans aucun doute l'importance de la protéine Tax dans le processus précoce de transformation lors de l'infection par HTLV-1. Toutefois, il est à noter qu'au cours des étapes plus tardives, il est rare de détecter l'expression de Tax. En effet, la détection des transcrits *tax* est très réduite dans les cas d'ATL (décrit couramment comme étant inférieur à 40 %, mais inférieur à 2 % selon certaines études) [Matsuoka and Jeang, 2007, Kataoka et al., 2015].

Cette perte d'expression a plusieurs sources. Il a tout d'abord été démontré que le LTR 5' du provirus de HTLV-1 pouvait être délété, particulièrement dans les cellules issues de formes agressives d'ATL, suggérant que ces délétions pourraient être une conséquence de la forte instabilité génétique dans ces cellules [Tamiya et al., 1996]. Plus tard, des phénomènes d'accumulation de mutations au niveau de la séquence codante de Tax ont été rapportés [Furukawa et al., 2001, Takeda et al., 2004]. Enfin, la répression de Tax peut également être médiée par des mécanismes d'inhibition épigénétique du LTR 5', mettant en jeu notamment des mécanismes de méthylation [Koiwa et al., 2002, Takeda et al., 2004, Taniguchi et al., 2005].

À l'échelle de l'infection, cette perte d'expression de Tax fait sens au regard du fort potentiel immunogène de Tax qui, comme nous l'avons vu, est une des principales cibles des lymphocytes cytotoxiques spécifiques de HTLV-1. Mais cela pose la question du maintien des mécanismes de transformation une fois l'expression de Tax abolie. Il s'avère que si le LTR 5' est parfois inactivé, le LTR 3' semble toujours actif et intact, ce qui soulève l'hypothèse de l'influence du gène *hbz* et de la protéine qu'il code dans ce maintien [Matsuoka, 2010].

C.2. Maintien de la transformation par HBZ

La protéine HBZ (pour *HTLV-1 bZIP factor*) est une protéine anti-sens exprimée sous le contrôle du LTR 3', d'une taille allant de 206 à 209 aa selon les variations d'épissage [Gaudray et al., 2002, Larocca et al., 1989]. La protéine HBZ interagit avec les facteurs de transcription JunD et CREB, médiant notamment l'inhibition de la transcription à partir du LTR 5', et donc de l'expression de la protéine Tax [Gaudray et al., 2002, Basbous et al., 2003].

Concernant l'implication de HBZ dans la transformation cellulaire, le transcrit *hbz* a été décrit comme un régulateur notamment de l'expression de E2F1, ce qui promeut la proliféra-

tion des cellules T [Satou et al., 2006, Kawatsuki et al., 2016]. Il est notable que cet effet est médié par l'ARN et non par la protéine HBZ. Cette dernière est responsable de l'inhibition de la voie canonique NF- κ B, ainsi que de la voie Akt [Zhao et al., 2009, Thébault et al., 2004]. En revanche, HBZ est connu comme un activateur de la voie du TGF- β (pour *Transforming Growth Factor β*) [Panfil et al., 2016]. En parallèle, HBZ est capable d'induire la prolifération des lymphocytes T en stabilisant le facteur THEMIS (*Thymocyte Expressed Molecule*, impliqué dans la survie cellulaire lors du développement thymique) et en induisant l'expression du récepteur de chimiokines CCR4 [Kinosada et al., 2017, Sugata et al., 2016]. HBZ est également capable d'inhiber l'apoptose en stabilisant le facteur MCL-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*) (Figure 1.14) [Mukai and Ohshima, 2017].

Les virus HTLV-1 portant d'importantes délétions dans le transcrit *hbz* sont toujours capables d'immortaliser des lymphocytes T, prouvant que ce facteur n'est pas indispensable à la transformation [Arnold et al., 2006]. Toutefois, il été montré que l'extinction de HBZ inhibe la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 *in vitro*, et conduit à l'induction de tumeurs de plus petites tailles dans un modèle de souris NOG (présentant des dysfonctionnement des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des macrophages, ainsi qu'une absence de lymphocytes NK), prouvant son implication dans le processus oncogène [Arnold et al., 2008].

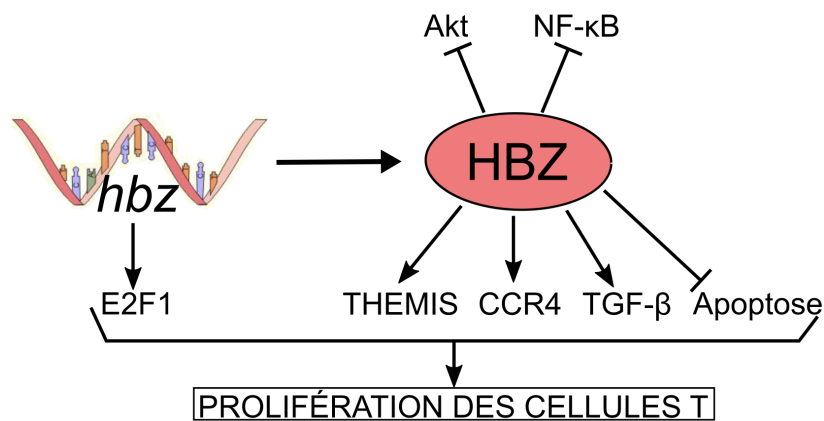


FIGURE 1.14 – Effets du transcrit *hbz* et de la protéine HBZ sur la prolifération cellulaire

HBZ concourt au maintien de la prolifération des cellules T infectées par HTLV-1, sous sa forme protéique mais aussi par action directe de son ARN. En parallèle de l'inhibition des voies Akt et NF- κ B, HBZ est ainsi capable d'inhiber l'apoptose et de promouvoir la prolifération en agissant sur diverses voies cellulaires.

NB : Les effets de HBZ sur le LTR 5' ne sont pas représentés.

C.3. De la transformation à l'oncogenèse

Tous les mécanismes détaillés précédemment concernent la transformation, c'est-à-dire l'ensemble des phénomènes aboutissant à la perte de contrôle du cycle cellulaire, à l'induction d'une prolifération cellulaire anormale ainsi qu'à l'établissement de certaines mutations à l'origine notamment de l'indépendance à l'IL-2. La transformation ne saurait évidemment se confondre avec l'oncogenèse, phénomène bien plus large dont la transformation n'est que l'initiation, et qui comprend encore de nombreuses étapes d'acquisition de mutations permettant notamment l'établissement de tumeurs. Cette différence est cruciale pour la bonne compréhension des mécanismes d'induction de l'oncogenèse virale. En effet, le faible nombre de patients infectés déclarant effectivement un cancer (paramètre généralisable à l'ensemble des virus oncogènes humains) trouve son explication dans les nombreux obstacles potentiels à la réalisation de l'oncogenèse par les cellules transformées, et dont le principal est le système immunitaire.

Dans ce contexte, la protéine Tax initie les déséquilibres de la physiologie cellulaire aboutissant à la transformation. Le passage de cette transformation à une oncogenèse complète se fait principalement par le biais de mutations somatiques résultant de l'instabilité génétique induite principalement par Tax [Kataoka et al., 2015]. La question de la perte d'expression de Tax et du maintien de ses fonctions transformantes ne sont donc pas forcément pertinentes sur le long terme, car une fois les mutations pro-oncogènes apparues, l'oncogenèse s'autonomise par rapport aux oncoprotéines virales.

En dehors de l'induction de mutations somatiques, un autre mécanisme initié par Tax induisant de nombreuses modifications susceptibles de devenir autonomes est la modification du profil d'expression de plusieurs miARN (pour *micro-ARN*) [Sampey et al., 2012]. L'importance de ces petits ARN dans l'oncogenèse de manière générale est un domaine récent en pleine expansion. Chaque miARN étant capable de réguler l'expression de gènes cellulaires, ils constituent l'une des dernières modalités de régulation de l'expression génétique mise au jour. Tax module l'expression d'un certain nombre de miARN impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, comme miR-21, miR-93 et miR-155 [Man et al., 2008, Bellon et al., 2009, Tomita, 2012]. Par la modulation de l'expression des miARN miR-143-p3 et miR146a, Tax promeut également la prolifération cellulaire [Bellon et al., 2009, Tomita et al., 2012]. Enfin, par l'intermédiaire de miR-149 et miR-873, Tax provoque de durables modifications des facteurs de remodelage de la chromatine, provoquant des modifications d'expression génétique de grande ampleur, participant ainsi potentiellement à amplifier l'instabilité génétique dans les cellules infectées [Rahman

et al., 2012]. Ainsi, l'effet de ces miARN persiste même après l'extinction de l'expression de Tax. Plus récemment, HBZ a également été décrit comme un modulateur de miARN, induisant une augmentation de la prolifération et de l'instabilité génétique par l'intermédiaire de miR-17, miR-21, miR-23b, et miR-27b [Vernin et al., 2014].

C.4. Persistance d'une fonction de Tax ?

Les mécanismes de transformation autonomes de Tax permettent d'envisager la perte d'expression de Tax lors des phases tardives de l'infection sans hypothéquer l'oncogenèse. Ce modèle de répression de Tax est communément admis par la communauté, et pourtant certains développements récents semblent le remettre en cause.

Il a notamment été démontré, par des travaux réalisés au sein du groupe dirigé par Ali Bazarbachi, que l'efficacité du traitement de l'ATL couplant Arsenic et interféron reposait notamment sur la dégradation de Tax [Dassouki et al., 2015]. Cette conclusion est étonnante, car il est communément admis que cette expression est négligeable, voire nulle. Au cours de cette étude, il a été montré que l'inhibition de l'expression de Tax par le biais de shARN (pour *short hairpin ARN*) provoquait une diminution drastique de la prolifération de cellules MT1, lignée pourtant réputée pour exprimer des taux de Tax non-détectables en immunodétection. À partir de là, la question de l'importance fonctionnelle de Tax dans les cellules ATL et au cours des étapes tardives de l'infection se pose à nouveau.

Les éléments, très récents, qui vont peut-être apporter une réponse à ce questionnement ont été obtenus par une approche d'étude à l'échelle de la cellule unique, comme effectué notamment dans le groupe dirigé par Charles Bangham. Le suivi, par une technique de FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridization*), de l'expression à partir des LTR 5' et 3' de HTLV, effectué sur des cellules de patients ATL, a montré que, alors que la plupart des cellules présentent une activité transcriptionnelle sous le contrôle du LTR 3' anti-sens (et donc l'expression du transcrit *hbz*) à un niveau faible, de rares cellules présentent une activité transcriptionnelle sous le contrôle du LTR 5' (et donc l'expression de Tax, sous réserve de l'absence de mutations inhibitrices) à un niveau extrêmement élevé. Ce haut niveau d'expression est appelé *transcriptional burst* (que l'on pourrait traduire par *poussée d'activité transcriptionnelle*) par les auteurs [Bilman et al., 2017]. Sans se lancer dans une analyse linguistique poussée, il est intéressant de constater que l'expression même de *burst* amène à se poser la question de l'évolution de l'expression du LTR 5' au cours du temps à l'échelle de la cellule unique.

III. RÔLE DE TAX DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Cette étude au cours du temps a été réalisée, au niveau protéique, par le groupe dirigé par Masao Matsuoka. Dans cette étude, des cellules de la lignée MT1 exprimant un rapporteur GFP caractérisé par une demi-vie très courte sous le contrôle d'éléments répondant à Tax ont été étudiées en microscopie dynamique sur cellules non-fixées. Ces données montrent que les cellules MT1 présentent des *burst* d'expression de Tax, à l'échelle de la cellule unique. Ces *burst* de Tax s'accompagnent notamment d'une activation de la voie NF- κ B et semblent importantes pour l'inhibition de l'apoptose, et donc la survie de ces cellules [Mahgoub et al., 2017]. Ces résultats montrent comment il est possible d'avoir une situation dans laquelle l'expression de Tax est importante fonctionnellement, sans avoir de forte expression de Tax à chaque instant. Ainsi, les *burst* de Tax étant réparties au cours du temps et ne concernant qu'une minorité de cellules au sein de la population à un instant donné, le niveau de Tax à l'échelle de cette population est négligeable, mais l'effet de Tax au cours du temps semble crucial pour la survie des cellules. Cette découverte, si elle se confirme, est d'une grande importance pour replacer le rôle de Tax dans le schéma global de l'oncogenèse liée à HTLV-1. Cela complexifie le modèle d'oncogenèse, en suggérant l'existence de potentielles phases intermittentes de ré-induction de certaines voies proto-oncogènes au cours du temps (Figure 1.15). La question qui se pose maintenant est de savoir si toutes les fonctions connues de Tax réapparaissent lors de ces phases d'expression transitoire de Tax.

L'ensemble de ces éléments démontre l'importance de Tax dans le processus oncogène lié à l'infection par HTLV-1. Parmi la multitude d'effets associés à Tax sur la physiologie cellulaire, nous allons maintenant revenir en détails sur l'induction de la voie NF- κ B.

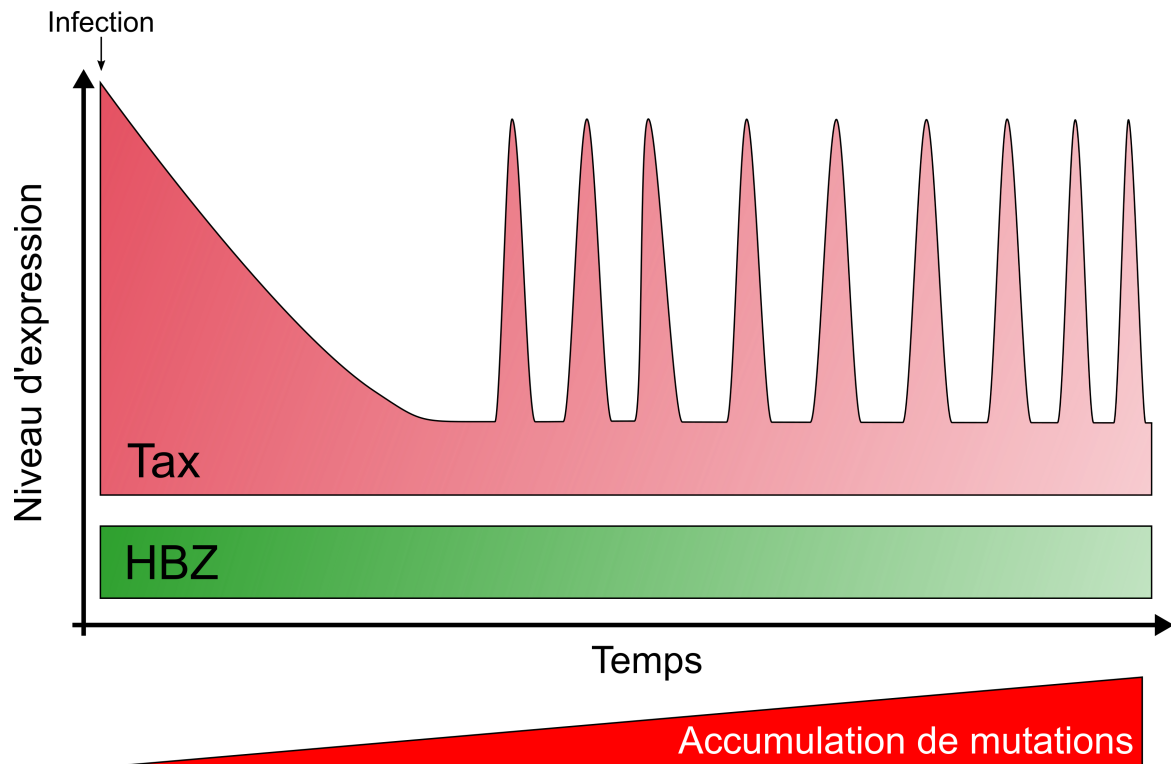


FIGURE 1.15 – Modèle des rôles complémentaires de Tax et HBZ dans la transformation cellulaire

Contrairement à HBZ dont l'expression est continue et modeste, l'expression de Tax semble être caractérisée, après une importante diminution à l'issue des phases précoces d'infection, par des poussées d'expression successives. Les conséquences fonctionnelles de ces poussées restent à déterminer, mais il est d'ores et déjà acquis qu'elles jouent un rôle important dans la survie des cellules infectées.

IV Les modalités d'induction de la voie NF- κ B médiée par Tax

A. Rôle biologique et fonctionnement de la voie NF- κ B

A.1. La voie NF- κ B et ses conséquences sur l'inflammation et la survie cellulaire

a) **La voie NF- κ B dans l'activation de l'inflammation** L'induction de la voie NF- κ B est une étape majeure de l'activation de la réponse immunitaire et du déclenchement de l'inflammation. Cette activation fait suite à la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP*) par des récepteurs de PAMP (ou *Pattern-Recognition Receptors, PRR*), présents à la membrane plasmique, à la membrane des endosomes, dans le cytoplasme ou encore dans le noyau [Palm and Medzhitov, 2009, Di-

ner et al., 2015]. La liaison de ces PRR avec les PAMP correspondants induit l'activation de plusieurs voies de signalisation aboutissant à la production de médiateurs inflammatoires et éventuellement anti-viraux. La voie NF- κ B est la principale de ces voies inflammatoires, et aboutit à la translocation nucléaire des facteurs NF- κ B dans le noyau, induisant l'expression de diverses cytokines inflammatoires [Karin and Delhase, 2000].

Ces cytokines participent notamment au recrutement des cellules immunitaires, ainsi qu'à l'induction de mécanismes anti-viraux intracellulaires chez les cellules voisines.

b) La voie NF- κ B dans la survie et la prolifération cellulaires L'autre effet majeur de la voie NF- κ B est la promotion de la survie et de la prolifération cellulaires. En effet, de nombreux gènes activés par NF- κ B vont promouvoir la prolifération cellulaire (comme le facteur *c-myc*) ou inhiber l'apoptose (comme le facteur Bcl-xl). Dans le contexte de la physiologie immunitaire, l'activation de la voie NF- κ B au sein des cellules T suite à l'engagement de leur récepteur (*T Cell Receptor*, ou TCR) participe à l'activation des lymphocytes T, comme nous le verrons plus loin. Cette promotion de la prolifération cellulaire fait de la voie NF- κ B un acteur majeur des phénomènes de transformation cellulaire, en contexte infectieux ou non [Xia et al., 2014].

A.2. Modalités physiologiques d'induction de la voie canonique NF- κ B dans les cellules T

Les cibles principales du virus HTLV-1 étant les lymphocytes T, nous allons nous intéresser aux modalités d'activation de la voie NF- κ B dans ces cellules.

Rappel sur le fonctionnement de la machinerie d'ubiquitination Avant d'aborder l'induction de la voie NF- κ B, nous allons rappeler les grandes lignes du fonctionnement de la machinerie cellulaire d'ubiquitination, dont le rôle est primordial dans l'activation de la voie NF- κ B. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés dont la liaison covalente sur une protéine cellulaire constitue une modification post-traductionnelle pouvant aboutir à l'adressage de cette protéine, selon le type d'ubiquitination. La liaison covalente de l'ubiquitine sur la protéine-cible met en jeu une liaison isopeptide, et cible donc un groupement amine. En conséquence, l'ubiquitination concerne principalement les lysines, mais peut également se faire à l'extrémité amino-terminale. Le mécanisme d'ubiquitination fait intervenir 3 types d'enzymes différentes : les enzymes activatrices E1, les enzymes de conjugaison E2 et les enzymes ubiquitines-ligases

E3. L'ubiquitine est prise en charge par une enzyme E1, ce qui conduit à son activation (par carboxylation). L'ubiquitine est ensuite transférée à une enzyme E2, puis sur une lysine de la protéine acceptrice par l'intermédiaire de l'enzyme E3.

L'ubiquitine possédant elle-même dans sa séquence plusieurs résidus lysine, il est possible de polymériser des chaînes de poly-ubiquitine mettant en jeu les groupements lysines internes à l'ubiquitine. Le nom de la chaîne de poly-ubiquitine est fonction de la lysine servant au branchement des ubiquitines entre elles. Par exemple, les chaînes liées par les lysines 48 sont appelées poly-ubiquitination de type K48. Les différents motifs d'ubiquitination sont associés à des fonctions différentes, les chaînes de type K48 entraînant généralement un adressage au protéasome. À côté de ces cas simples de chaînes monotones, la formation de chaînes mixtes de poly-ubiquitine est possible, dans la limite des contraintes stériques qui s'appliquent aux différents résidus lysine de l'ubiquitine.

a) Contexte de l'activation de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T L'activation de la voie NF- κ B intervient physiologiquement dans le processus d'activation des lymphocytes T lors de leur activation par l'interaction avec une cellule présentatrice de l'antigène (CPA), comme une cellule dendritique. Lors de cette rencontre se forme une synapse immunologique entre les deux cellules, induisant l'activation du lymphocyte par diverses interactions moléculaires, comme l'interaction spécifique entre le TCR et un antigène présenté au sein du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Cette reconnaissance, parfois appelée *engagement du TCR*, aboutit notamment à l'activation de la voie NF- κ B.

b) Signalisation induite par l'engagement du TCR L'engagement du TCR est à l'origine de nombreuses réorganisations cellulaires au niveau de la face cytosolique de la synapse immunologique. Le lymphocyte se polarise, entraînant le recrutement de nombreux facteurs en aval du TCR. Parmi les acteurs majeurs de la signalisation cellulaire activés après l'engagement du TCR, on compte les facteurs PDK1 et GLK1, à l'origine de la phosphorylation activatrice de la kinase PKC θ , elle-même à l'origine de la formation du complexe CARMA-Bcl10-MALT1 [Villalba et al., 2000, Lee et al., 2005, McAllister-Lucas et al., 2001, Lin and Wang, 2004].

Jusqu'au milieu des années 2000, cette voie moléculaire a été décrite de plus en plus finement, avec un intérêt particulier apporté aux phénomènes de recrutement des différents effecteurs à la membrane située au niveau de la synapse immunologique, notamment par le truchement de mécanismes d'échafaudage moléculaire [Lin and Wang, 2004]. Le modèle communément admis

comprenait la présence d'un certain nombre d'acteurs présents à l'état inactif au niveau des domaines cytoplasmiques des récepteurs impliqués dans la synapse immunologique, capables d'initier les phases précoces de la signalisation et de provoquer un recrutement d'autres facteurs en faisant intervenir le cytosquelette [Jacobelli et al., 2004]. Cette vision a toutefois été remise en cause par la mise en évidence de plusieurs complexes de signalisation cytosoliques qui succèdent aux signalosomes membranaires. Ces complexes n'ont apparemment aucun ancrage à la membrane plasmique et ne nécessitent pas d'action du cytosquelette pour leur formation [Schaefer et al., 2004, Balagopalan et al., 2009].

Les signalosomes décrits par Brian Schaefer se présentent sous la forme de structures filamenteuses semblables aux filaments cytoplasmiques riches en caspases, induisant la mort cellulaire (*Death-Effector Filaments*), d'où est tiré leur nom : les POLKADOTS (pour *Punctate and Oligomeric Killing or Activating DOmains Transducing Signals*) [Siegel et al., 1998, Schaefer et al., 2004]. Ces POLKADOTS se forment suite à l'engagement du TCR et ont été caractérisés comme des structures fonctionnelles importantes pour la signalisation NF- κ B, composés d'oligomères de divers effecteurs de cette voie comme Bcl10 et MALT1. La présence de MALT1 permet ensuite le recrutement de l'E3-ubiquitine ligase TRAF6, ce qui promeut notamment l'auto-ubiquitination de TRAF6 ainsi que l'ubiquitination de MALT-1 et Bcl10, permettant le recrutement et l'activation du complexe régulateur IKK de la voie NF- κ B [Sun et al., 2004, Rossmann et al., 2006] (Figure 1.16).

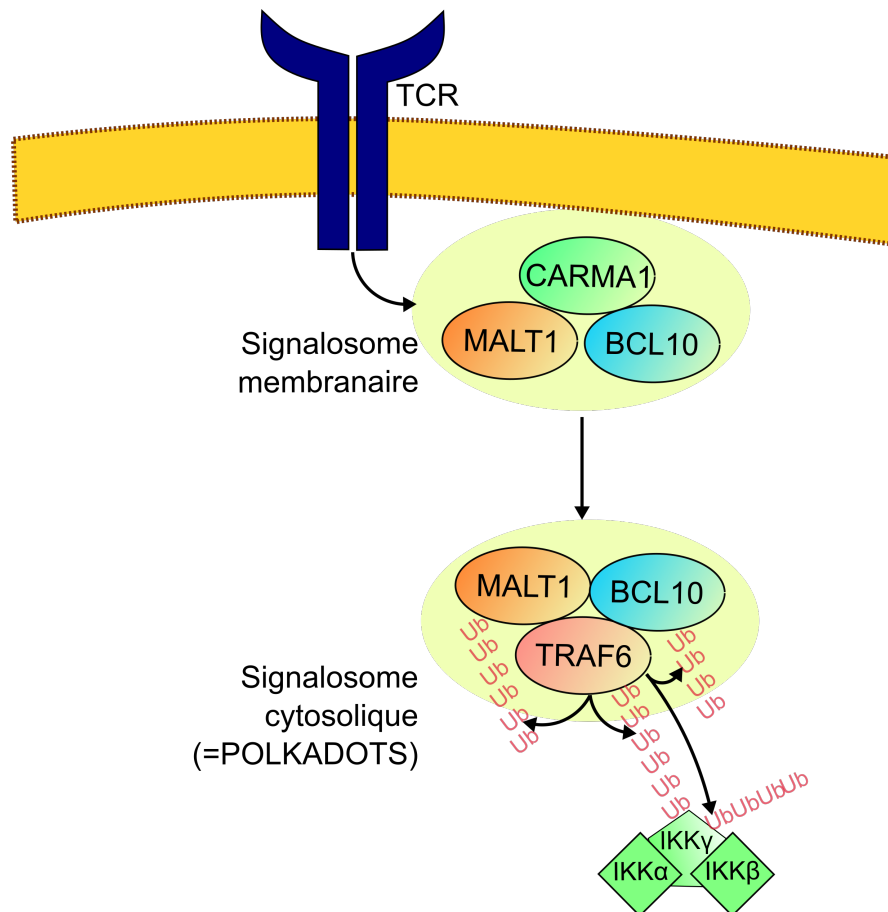


FIGURE 1.16 – Voie de recrutement du complexe IKK après engagement du TCR

Le recrutement du complexe IKK, nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B, à la suite de l'engagement du TCR, fait intervenir divers complexes de signalisation. Aux premiers complexes, ancrés à la membrane, succèdent des signalosomes cytosoliques (les POLKADOTS) au niveau desquels s'effectue le recrutement de TRAF6. L'E3-ligase TRAF6 induit sa propre poly-ubiquitination, ainsi que celle des autres composants des POLKADOTS. Ces chaînes de poly-ubiquitine sont les structures de recrutement de IKK γ qui est à son tour poly-ubiquitiné par TRAF6

Schéma adapté du modèle établi par l'équipe de Brian Schaefer [Paul and Schaefer, 2013].

A.3. Le complexe régulateur IKK

a) **Présentation des membres du complexe IKK** On entend par *complexe IKK* le complexe formé des trois sous-unités IKK α , IKK β et IKK γ (également appelé NEMO, pour *NF- κ B Essential MOdulator*), bien que certaines études ont montré qu'à l'inverse des premiers modèles établis, IKK γ est associé soit à IKK α , soit à IKK β , mais pas aux deux facteurs simultanément [Fontan et al., 2007]. Parmi ces trois facteurs, on peut distinguer IKK α et IKK β , portant une activité kinase, de IKK γ qui n'en possède pas et qui joue un rôle de régulateur.

b) Les kinases IKK α et IKK β : caractéristiques et activation Ces deux facteurs sont des kinases à sérine et thréonine partageant un fort taux d'identité de séquence (50 %), capables de s'associer en dimères homo- ou hétérophiles par leur domaine en *leucine zipper*. Ces deux kinases revêtent une forte importance fonctionnelle dans l'activation de la voie NF- κ B, en induisant la dégradation des inhibiteurs I κ B comme nous le verrons par la suite. L'induction de la voie NF- κ B passe donc par leur activation, qui peut se faire de différentes manières.

IKK α et IKK β possèdent tous les deux un domaine inhibiteur, composé de résidus sérine, dont la phosphorylation aboutit à l'activation de ces kinases. Cette phosphorylation contrôlant leur activité enzymatique peut être obtenue soit par la phosphorylation par une autre kinase, appelée *kinase activatrice*, soit par auto-phosphorylation suite à l'oligomérisation des IKK [Fontan et al., 2007]. Les principales kinases activatrices des IKK identifiées à ce jour sont TAK1 (*TGF- β -activating kinase 1*), NIK (pour *NF- κ B Inducing Kinase*), ainsi que la famille des kinases MEK (pour *MAPK/ERK Kinase*) [Sato et al., 2005, Senftleben et al., 2001, Hagemann and Blank, 2001].

Dans le cas de l'activation de la kinase IKK β , un contrôle supplémentaire existe, exercé par la troisième sous-unité du complexe IKK : la sous-unité IKK γ .

c) La sous-unité régulatrice IKK γ La sous-unité régulatrice IKK γ est une protéine de 419 acides aminés, identifiée très tôt comme permettant l'activation de la voie NF- κ B. Elle contient plusieurs domaines permettant d'établir des interactions protéines-protéines, comme des domaines *coiled-coil*, un domaine *leucine zipper*, un domaine en doigt à Zinc ainsi que des domaines de liaison aux chaînes d'ubiquitine. Par son domaine *coiled-coil* situé à l'extrémité N-terminale, elle est notamment capable d'interagir avec les kinases IKK α et IKK β [May et al., 2000]. Ne comportant aucun domaine kinase mais de nombreux domaines d'interactions, IKK γ joue le rôle de protéine adaptatrice permettant le recrutement des kinases IKK à proximité de leurs kinases activatrices.

Il est intéressant de noter que la fonction de IKK γ est modulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation au niveau de résidus situés dans le domaine d'interaction avec IKK β , régulant ainsi l'interaction entre ces deux facteurs et conséquemment l'activation de IKK β . En outre, la poly-ubiquitination en K63 (où les résidus d'ubiquitine sont eux-mêmes reliés entre eux par leur lysine en position 63) de IKK γ joue également un rôle, permettant de recruter les facteurs TAB (pour TAK1 *binding protein*), constituant le complexe permettant le recrutement de TAK1. La capacité de IKK γ à interagir de manière

non-covalente avec des chaînes de poly-ubiquitine joue également un rôle important pour le recrutement de $\text{IKK}\gamma$ par des protéines adaptatrices présentant des chaînes de poly-ubiquitination liées en K63 [Cordier et al., 2009].

Pour remettre le recrutement des IKK dans le contexte de l'engagement du TCR, le recrutement de TRAF6 et sa poly-ubiquitination en K63 au niveau des POLKADOTS promeut le recrutement et la poly-ubiquitination de $\text{IKK}\gamma$ en K63, permettant à son tour le recrutement de TAK1 [Sun et al., 2004, Ni et al., 2008]. Ce recrutement permet l'activation de la voie canonique NF- κ B, comme nous allons le voir.

A.4. Dégradation de l'inhibiteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ de la voie NF- κ B

L'activation de la voie NF- κ B est obtenue suite à l'activation de la kinase $\text{IKK}\beta$ par $\text{IKK}\gamma$. Une fois activée, $\text{IKK}\beta$ va catalyser la phosphorylation d'un inhibiteur de la voie canonique, dont le principal représentant est $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ inhibe la voie NF- κ B en provoquant la séquestration cytosolique des facteurs canoniques NF- κ B que sont les dimères p50-p65/RelA et p50-c-Rel. En interagissant avec ces facteurs, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ masque le domaine NLS (pour *Nuclear Localization Sequence*) de p65/p50, empêchant ces facteurs de migrer jusqu'à l'intérieur du noyau.

La phosphorylation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ par $\text{IKK}\beta$ va provoquer sa poly-ubiquitination de type K48 puis sa prise en charge par le protéasome 26S [Karin and Ben-neriah, 2000]. L'exposition nouvelle du NLS des facteurs p65/p50 provoquée par la dégradation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ permet la localisation nucléaire de ces facteurs et leur interaction avec les séquences spécifiques κ B situées dans les promoteurs en amont des gènes cibles [Ghosh et al., 1998] (Figure 1.17).

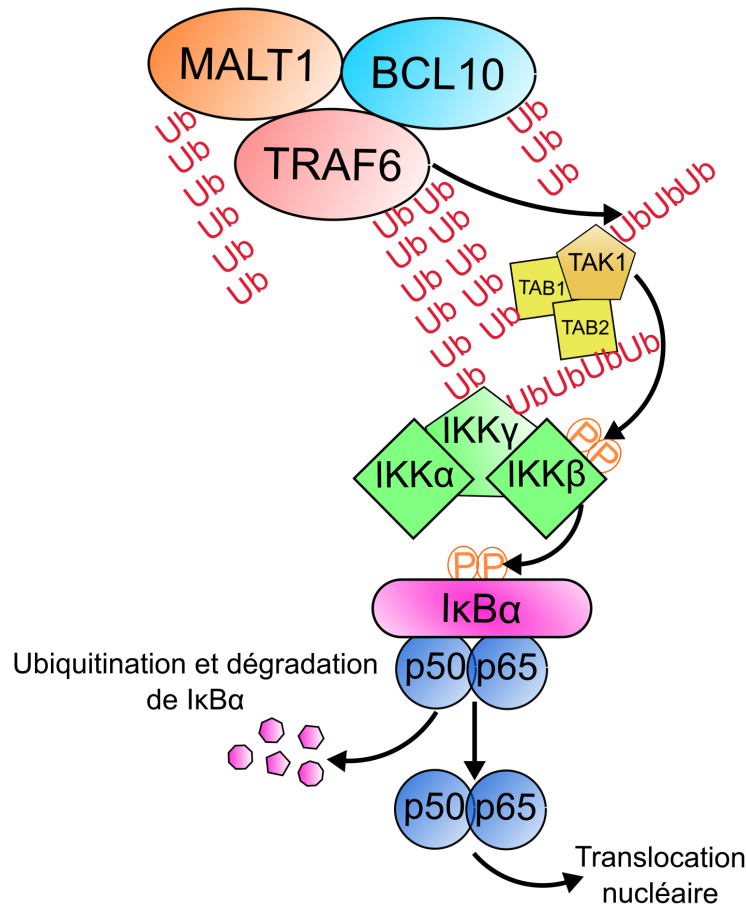


FIGURE 1.17 – Activation de la voie NF- κ B par le complexe régulateur IKK dans la signalisation TCR

Une fois le complexe IKK recruté par ubiquitination de TRAF6, la kinase activatrice TAK1 est recrutée au niveau des chaînes de poly-ubiquitine par l'intermédiaire d'un complexe composé de facteurs TAB. Puis, après ubiquitination de TAK1 par TRAF6 (ce qui augmente son activité kinase), TAK1 induit la phosphorylation activatrice de IKK β . IKK β phosphoryle à son tour le facteur inhibiteur I κ B α qui séquestre les facteurs NF- κ B p50 et p65 dans le cytosol. Cette phosphorylation induit l'ubiquitination dégradative de I κ B α , la libération du dimère p50/p65 et sa translocation nucléaire.

NB : seuls les facteurs TAB1 et TAB2 sont représentés

A.5. Autres contextes d'induction de la voie NF- κ B

Nous avons détaillé précédemment le mécanisme d'activation de la voie NF- κ B dans le contexte de l'activation des lymphocytes T par l'engagement du TCR, particulièrement pertinent pour l'étude des relations entre le virus HTLV-1 et la voie NF- κ B de ses cellules cibles. Néanmoins, le détournement de la voie NF- κ B par la protéine virale Tax s'effectuant en aval des récepteurs, il est intéressant de citer les autres contextes existants d'activation de la voie canonique NF- κ B ainsi que leurs médiateurs moléculaires précoces (Figure 1.18).

Ainsi, l'induction de la NF- κ B peut être obtenue par l'activation du récepteur du TNF- α (TNFR) par son ligand. Cette induction, qui constitue l'exemple classique de l'activation de la voie NF- κ B fait intervenir le facteur TRADD (pour *TNFR-associated death domain*) associé au récepteur. TRADD est lui-même lié à la protéine effectrice TRAF2 par l'intermédiaire de l'adaptateur RIP-1 (pour *Receptor Interacting Protein 1*) [Hsu et al., 1996]. Le fonctionnement de TRAF2 est analogue à TRAF6. Cette protéine possède une activité E3-ligase médiant sa propre poly-ubiquitination, ainsi que celle de RIP-1, permettant le recrutement de IKK γ puis sa poly-ubiquitination médiant le recrutement des kinases activatrices des IKK [Hayden and Ghosh, 2014] (Figure 1.18).

NF- κ B peut également être induit suite à l'activation des récepteurs à l'Interleukine-1 (IL-1R) et des récepteurs TLR (pour *Toll-Like Receptors*) par leurs ligands respectifs. Cette signalisation est obtenue par l'activation des protéines effectrices TRAF6 et TRAF2. Ces protéines effectrices sont reliées aux facteurs associés aux récepteurs que sont MyD88 et TRIF, par l'intermédiaire des adaptateurs IRAK4/1 et RIP [Sasai et al., 2010]. De manière analogue aux autres voies, cette activation met en jeu l'activation d'un facteur TRAF puis l'ubiquitination de divers facteurs par ce dernier, permettant le recrutement et l'activation du complexe IKK (Figure 1.18). Dans le cas du récepteur IL-1R, la voie d'activation est similaire car la région cytosolique de ce récepteur présente également un domaine TIR, associé à MyD88 [Jefferies et al., 2001] (Figure 1.18).

Citons enfin l'induction de la voie NF- κ B lors la réception du facteur CD40-ligand par son récepteur CD40. Elle fait également intervenir l'activation du facteur TRAF6 [Hayden and Ghosh, 2014]. De manière intéressante, ce mode d'activation de la voie NF- κ B n'est pas la seule voie d'activation de NF- κ B par le récepteur CD40. En effet, ce facteur a la particularité de pouvoir également activer une autre voie NF- κ B, appelée voie alterne.

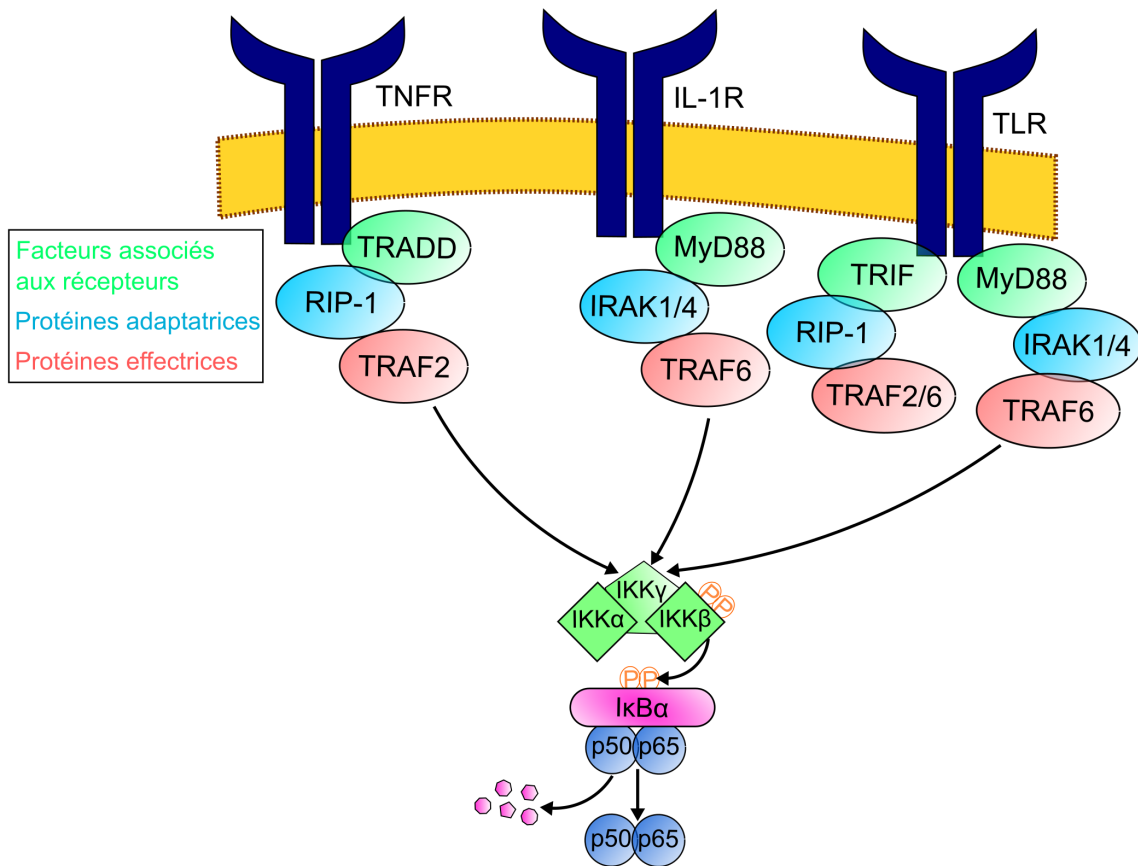


FIGURE 1.18 – Autres voies d’induction de NF- κ B

L’induction de la voie NF- κ B par des modalités autres que l’engagement du TCR font intervenir des facteurs et des types de facteurs communs. On y retrouve des facteurs associés aux différents récepteurs, liés aux protéines effectrices par l’intermédiaire de différentes protéines adaptatrices. La prépondérance effectrice de la famille des facteurs TRAF est notable. Les E3-ligases TRAF vont ensuite recruter IKK γ par le biais de chaînes de poly-ubiquitine comme nous l’avons vu précédemment.

Pour l’heure, l’implication de signalosomes cytosoliques a été caractérisée uniquement dans le cas du TCR, mais de récentes études suggèrent la présence de signalosomes cytosoliques dans d’autres voies, comme celle du TLR3 [Funami et al., 2016].

A.6. Activation alterne de la voie NF- κ B

a) **Inducteurs de la voie alterne NF- κ B** Tous les modes d’activation de la voie NF- κ B vus précédemment reposent sur l’activité de la kinase IKK β et sur la dégradation de l’inhibiteur I κ B α . On regroupe ces voies sous le terme de voies NF- κ B canoniques. Mais il existe d’autres modes d’activation de NF- κ B, non canoniques, dont une des voies est appelée alterne et que nous allons voir maintenant.

L'activation de la voie alterne NF- κ B passe également par l'activation du complexe régulateur IKK, mais contrairement à la voie canonique reposant principalement sur l'activité kinase de la sous-unité IKK β , la voie alterne repose sur l'activité kinase de la sous-unité IKK α [Senftleben et al., 2001].

L'activation de IKK α est permise par sa phosphorylation médiée principalement par le facteur NIK [Xiao et al., 2001]. L'originalité du mécanisme d'activation de cette voie réside en l'effet inhibiteur des facteurs TRAF2 et TRAF3. À l'état basal, ces deux facteurs sont liés à NIK et induisent sa dégradation. La réception du CD40L par le récepteur CD40 provoque un recrutement de TRAF2/3 au niveau de la région cytosolique de CD40, induisant la libération de NIK [Hayden and Ghosh, 2014].

b) Dégradation partielle de l'inhibiteur p100 de la voie alterne NF- κ B Les facteurs nucléaires de la voie alterne NF- κ B sont les facteurs p52 et RelB. A l'état basal, ces deux facteurs sont séquestrés dans le cytosol sous la forme d'un dimère contenant les protéines RelB et p100, précurseur de p52 [Bours et al., 1992, Siebenlist et al., 1994].

L'activation de cette voie se fait par recrutement de IKK α sur p100 après sa propre phosphorylation médiée par NIK. Une fois recruté sur p100, IKK α induit sa phosphorylation. Cette phosphorylation est à l'origine de la dégradation partielle du facteur p100, dont est issu le facteur p52 [Xiao et al., 2004]. Cette dégradation démasque la séquence NLS de p52 et RelB, qui vont transloquer au sein du noyau où ils pourront se fixer au niveau des séquences promotrices de leurs gènes cibles.

B. L'induction de la voie NF- κ B par Tax

Maintenant que nous avons vu les diverses modalités physiologiques d'activation des voies canoniques et alternes NF- κ B, nous allons détailler les modalités par lesquelles la protéine Tax du virus HTLV-1 interagit avec ces voies pour promouvoir une activation constitutive de NF- κ B.

B.1. La voie NF- κ B dans la transformation cellulaire médiée par HTLV-1

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'activation constitutive de la voie NF- κ B est une étape cruciale de la transformation cellulaire médiée par le virus HTLV-1. Les cellules ATL, comme les lignées de lymphocytes T *ex-vivo* exprimant Tax présentent une activation constitutive de NF- κ B, que ce soit par l'intermédiaire des facteurs p50 et p65 dans les cellules ATL

ou p50 et c-Rel dans les lignées lymphocytaires [Mori et al., 1999]. De plus, diverses études ont démontré l'importance de la voie NF- κ B dans l'établissement et la croissance des tumeurs induites par HTLV-1 dans des modèles animaux comme les souris NOG [Dewan et al., 2003]. En effet, un inhibiteur de la voie NF- κ B suffit à réduire significativement le volume des tumeurs développées par des souris NOG inoculées avec diverses lignées cellulaires transformées par HTLV-1.

Toutefois, le rôle de la voie NF- κ B dans la transformation cellulaire semble plus complexe qu'anticipé. Des travaux, réalisés principalement par le groupe dirigé par Chen-Zou Giam, ont en effet mis au jour un lien entre cette activation et la sénescence cellulaire. Ces travaux reposent principalement sur l'exploitation d'un système basé sur la transduction de cellules de la lignée HeLa par des vecteurs adéno- et lentiviraux permettant l'expression de Tax. Dans ces conditions, les cellules n'entrent plus en mitose et présentent un arrêt du cycle cellulaire se concluant par la sénescence de ces cellules [Yang et al., 2011]. Cette sénescence disparaît dans des cellules exprimant un mutant non-dégradable de l'inhibiteur $I\kappa B\alpha$, faisant le lien entre le niveau d'activation de la voie NF- κ B et cette sénescence, qui implique le facteur RelA [Zhi et al., 2011]. Lorsque HBZ est exprimé dans ces mêmes cellules, cette sénescence médiée par un excès d'activation de NF- κ B est fortement réprimée [Philip et al., 2014]. Cet effet de HBZ est à mettre en relation avec les fonctions inhibitrices de NF- κ B portées par ce facteur, que nous avons décrit plus tôt [Zhao et al., 2009].

Ces travaux mettent en évidence l'existence d'un effet dual de la voie NF- κ B sur la prolifération, avec l'induction de sénescence cellulaire lors de l'hyper-activation de cette voie. La régulation de la prolifération cellulaire semble impliquer une balance entre Tax et HBZ. Ce genre de balance a également été mis en évidence dans le cadre de l'infection par le virus oncogène KSHV. En effet, le facteur viral vFLIP de KSHV active la voie NF- κ B, ce qui résulte en l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence. Cet effet est contre-balançé par le facteur de latence viral vCyclin, inhibant cette sénescence [Zhi et al., 2015]. Ces balances permettent d'éviter les effets délétères d'une hyper-activation de la voie NF- κ B. Enfin, dans le contexte de la description récente des *burst* d'expression de Tax, il est possible d'imaginer que cette expression oscillante de Tax est un autre moyen de régulation de la prolifération.

B.2. Ubiquitination de Tax et recrutement du complexe IKK

a) Implication de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B Comme nous l'avons évoqué précédemment, la transformation cellulaire médiée par HTLV-1 a été associée très tôt à une action de Tax sur la voie NF- κ B. De premières études décrivant la capacité de Tax à lier les séquences génétique κ B ont conduit à tester l'hypothèse d'une activation de NF- κ B par Tax dans le processus de transformation [Ballard et al., 1988]. Cette hypothèse a été validée par la démonstration que certains mutants de Tax capables d'activer le LTR viral mais pas NF- κ B étaient incapables de transformer des fibroblastes de rat [Yamaoka et al., 1996]. D'autres études ont montré que la translocation nucléaire des facteurs NF- κ B en présence de Tax est liée à la dégradation du facteur I κ B α , et que cette dégradation était due à l'activation des kinases IKK, par une approche utilisant des mutants de Tax incapables d'activer NF- κ B [Sun et al., 1994, Geleziunas et al., 1998]. Cette modalité d'interférence d'une voie de signalisation cellulaire par un facteur viral en intervenant directement sur les facteurs cytosoliques en aval du récepteur est un mode d'action répandu au sein des virus [Zhao et al., 2015]. Toutefois, l'existence de certaines lignées transformées par HTLV-1 ne présentant pas d'expression de Tax suggère que Tax n'est pas le seul activateur de la voie NF- κ B [Mori et al., 1999].

L'activation de NF- κ B par Tax semble indépendant du facteur TRAF6, un mutant dominant négatif de TRAF6 n'ayant pas d'effet sur l'activation de NF- κ B par Tax [Geleziunas et al., 1998]. Pour autant, des études plus récentes ont montré que Tax est capable de promouvoir l'activité E3-ubiquitine ligase de TRAF6, qui serait notamment importante pour l'inhibition de l'apoptose au sein des cellules ATL [Yasunaga et al., 2011, Choi and Harhaj, 2014]. L'induction de NF- κ B par Tax semble donc passer principalement par les étapes en aval de TRAF6, impliquant de nombreux recrutements liés à l'ubiquitine. Nous allons nous pencher sur les modifications post-traductionnelles de Tax.

b) Ubiquitination et SUMOylation de Tax et activation de NF- κ B Comme nous l'avons décrit précédemment, Tax présente de nombreux résidus susceptibles de porter des modifications post-traductionnelles, et notamment des lysines capables d'être ubiquitinées ou SUMOylées.

Les chaînes de poly-ubiquitinations de type K63 portées par les lysines 4 à 8 de Tax sont apparues comme étant importantes pour l'activation de la voie NF- κ B et le recrutement du facteur IKK γ , le mutant de lysines Tax-K4-8R étant incapable de lier le complexe IKK ou d'activer un gène rapporteur NF- κ B [Nasr et al., 2006].

En parallèle, la poly-ubiquitination de Tax est à l'origine de son recrutement au niveau de radeaux lipidiques, où Tax recrute à son tour les facteurs du complexe régulateur IKK, stimulant la phosphorylation des kinases IKK, ce qui promeut l'activation de NF- κ B [Shembade et al., 2007, Huang et al., 2009].

Concernant la SUMOylation, l'importance fonctionnelle des résidus lysine 7 et 8, sujets à la fois à la SUMOylation et à l'ubiquitination, ainsi que la localisation nucléaire des formes SUMOylées de Tax a suggéré un potentiel rôle fonctionnel de cette modification dans l'activité de Tax. La localisation de Tax SUMOylé au niveau de corps nucléaires également positifs pour RelA et p300 a fait émerger un modèle dans lequel l'ubiquitination de Tax promeut l'activation des étapes cytosoliques de la voie NF- κ B et sa SUMOylation permet à Tax de recruter des facteurs de transcription au niveau des corps nucléaires, lieux supposés de l'activité transcriptionnelle de Tax [Nasr et al., 2006, Kfoury et al., 2011]. Ce modèle a été fortement remis en question par des études montrant qu'un mutant de Tax incapable de former des corps nucléaires activait la voie NF- κ B aussi bien que Tax sauvage et que les corps nucléaires sont très peu présents dans des cellules dérivées de patients infectés par HTLV-1 [Bonnet et al., 2012]. Cette étude suggère également que la SUMOylation pourrait favoriser l'ubiquitination de Tax. Ce caractère dispensable de la SUMOylation de Tax a été confirmé par une étude suivante, dans un contexte cellulaire déficient pour la SUMOylation au sein duquel Tax est toujours capable d'activer la voie NF- κ B [Pene et al., 2014]. Récemment, l'hyper-SUMOylation de Tax par les protéines SUMO2/3 a été décrite comme importante pour la dégradation de Tax au niveau des corps nucléaires PML (pour *ProMyelocytic Leukemia protein*), notamment en réponse à la thérapie arsenic/interféron [Dassouki et al., 2015].

L'ubiquitination de Tax est donc importante pour l'activation de la voie canonique NF- κ B, qui est proportionnelle au niveau d'ubiquitination de Tax [Bonnet et al., 2012]. L'inhibition de l'ubiquitination de Tax par l'inhibiteur CYLD suffit à inhiber l'activation de NF- κ B [Kovalenko and Chable-bessia, 2003, Trompouki et al., 2003, Wu et al., 2011]. En outre, bien que certaines études utilisant des systèmes de lignées cellulaires HEK 293T ont décrit une activation de NF- κ B par Tax indépendamment des chaînes de poly-ubiquitination de type K63, ces dernières semblent jouer un rôle important dans ce mécanisme, comme attesté par des études montrant l'inhibition de l'activation de la voie NF- κ B dans des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 incapables de synthétiser des chaînes de poly-ubiquitine en K63 [Gohda et al., 2007, Shembade et al., 2007].

c) Interactions entre Tax et les machineries d'ubiquitination et de SUMOylation Si l'enzyme de conjugaison E2 Ubc13 a été identifiée comme nécessaire pour la poly-ubiquitination de type K63 de Tax, la nature de l'E3-ubiquitine ligase impliquée est longtemps restée inconnue [Shembade et al., 2007]. Pour identifier cette enzyme et pour caractériser plus finement les modalités d'ubiquitination de Tax, de nombreuses études ont été menées en utilisant des systèmes sub-cellulaires permettant de manipuler des extraits cytosoliques purifiés. Ces systèmes ont permis de confirmer l'importance de la poly-ubiquitination de type K63 de Tax pour l'activation de NF- κ B, ainsi que l'identification de RNF8 (pour *RiNg Finger protein 8*) comme facteur portant une activité E3-ubiquitine ligase impliquée dans cette activation [Shibata et al., 2011, Ho et al., 2015] (Voir nouvelle en annexe). De manière intéressante, l'activation de RNF8 par Tax semble aboutir à la production de chaînes de poly-ubiquitine de type K63 qui ne sont pas fixées sur une protéine. Ces chaînes libres pourraient suffire à recruter IKK γ ainsi que les kinases activatrices de IKK β [Ho et al., 2015]. En parallèle, il a également été suggéré que Tax porte lui-même une activité E3-ubiquitine ligase, aboutissant à la synthèse des chaînes de poly-ubiquitine libres et mixtes (comportant plusieurs types de liaisons entre les ubiquitines) de manière indépendante d'Ubc13 [Wang et al., 2016]. Enfin, des études récentes ont décrit le recrutement du complexe LUBAC par les chaînes libres de poly-ubiquitine de type K63 induites par Tax. Ce complexe promeut alors la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type M1 (où les ubiquitines sont liées par leur résidu Methionine en position 1) et les chaînes mixtes de type K63 / M1 seraient alors à l'origine du recrutement de IKK γ [Shibata et al., 2017].

La SUMOylation de Tax est quant à elle médiée par l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9, qui est la seule enzyme E2 décrite à ce jour dans le processus de SUMOylation [Kfoury et al., 2011, Pene et al., 2014]. Parmi les dix SUMO E3-ligase connues, celle ou celles impliquées dans la SUMOylation de Tax n'ont pas été identifiées, même si des interactions au second degré entre Tax et certaines de ces enzymes ont été suggérées lors d'un crible double-hybride, comme l'E3 PIAS4 (pour *Protein Inhibitor of Activated STAT*) [Pichler et al., 2017, Simonis et al., 2012].

d) Synthèse de l'activation de la voie canonique NF- κ B par Tax Tous les éléments cités précédemment nous amènent à établir une synthèse (Figure 1.19). Malgré quelques éléments parfois contradictoires, Tax semble être capable d'interférer avec la voie canonique NF- κ B au niveau du facteur IKK γ , qu'il recrute au niveau des radeaux lipidiques membranaires dans la région golgienne par le biais de chaînes de poly-ubiquitine. Ces chaînes sont très probablement

des chaînes mixtes de type K63 / M1, où les chaînes de type K63 sont les premières à se former, induisant ensuite la formation des chaînes de type M1 après recrutement du complexe LUBAC. La formation de ces chaînes nécessite l'activité de l'enzyme de conjugaison E2 Ubc13, couplée à celle de l'E3-ligase RNF8, même si l'implication d'autres E3 ne peut être exclue.

Ce mécanisme semble être prépondérant. Toutefois, certains éléments laissent penser qu'il pourrait exister, parallèlement à ce mécanisme, des phénomènes d'activation de la voie cano-nique NF- κ B plus en amont, en modulant l'activation de TRAF6, ainsi que des mécanismes de formation de chaînes de poly-ubiquitine ne contenant pas de chaînes de type K63 médiées par une activité E3-ligase directement portée par Tax. Si ces derniers mécanismes ont réellement lieu, il est probable qu'ils aient une contribution fonctionnelle mineure en comparaison de ceux décrits plus tôt.

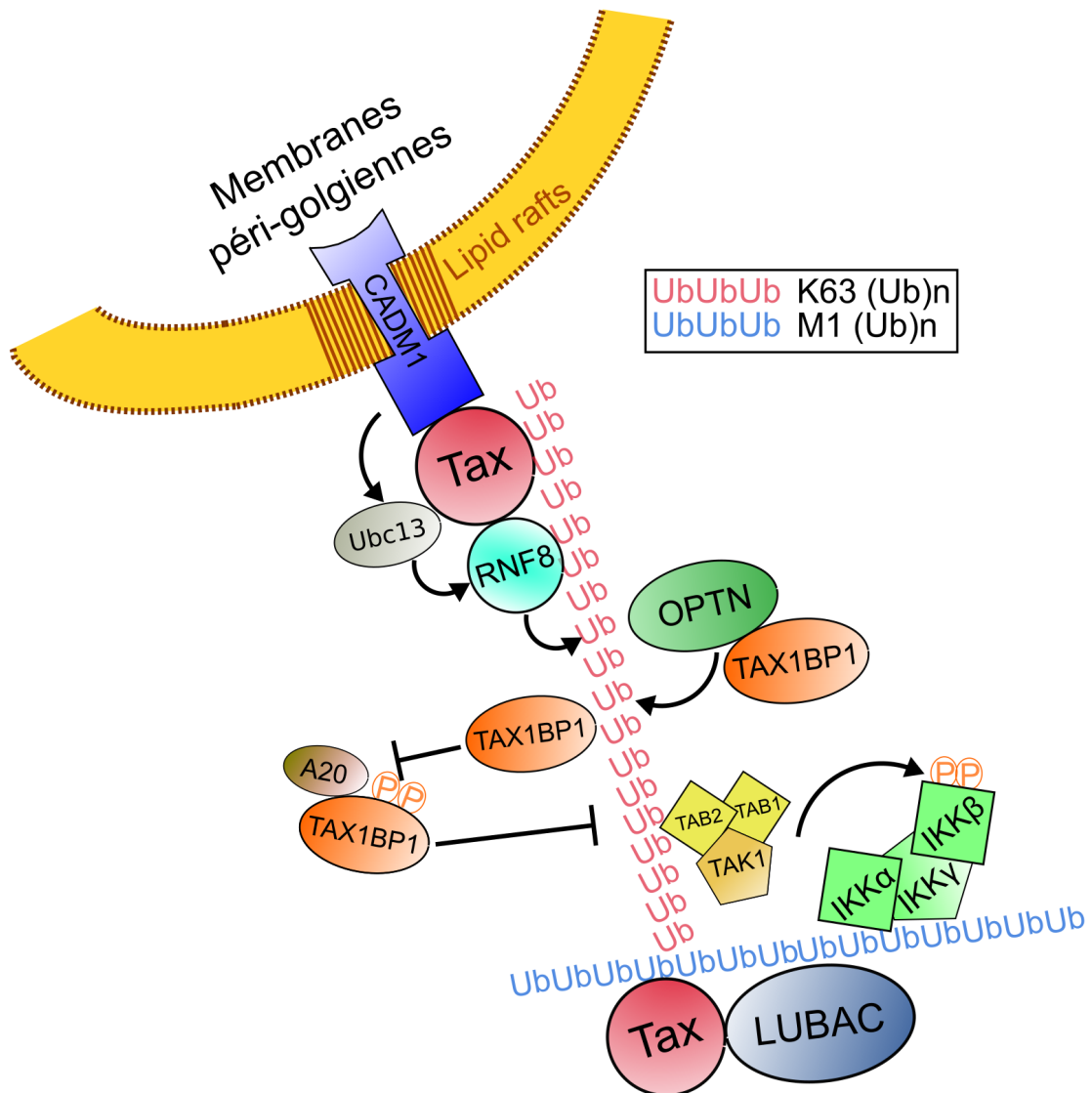


FIGURE 1.19 – Recrutement du complexe IKK par Tax et partenaires cellulaires régulant ce recrutement

Le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax mettent en œuvre diverses étapes de recrutement médiées par des chaînes de poly-ubiquitine. Les principaux partenaires cellulaires impliqués dans la régulation de ce recrutement agissent directement ou indirectement sur la synthèse de ces chaînes. Ainsi, Tax recrute des facteurs directement impliqués dans l'ubiquitination comme l'enzyme de conjugaison E2 Ubc13, l'E3-ligase RNF8 ou le complexe LUBAC. CADM1 est impliqué dans le recrutement de Ubc13 et les facteurs OPTN et TAX1BP1 modulent la stabilité des chaînes d'ubiquitine.

NB : seuls les facteurs TAB1 et TAB2 sont représentés

B.3. Activation de la voie alterne par Tax

En plus de l'activation de la voie canonique NF- κ B, Tax promeut également la voie alterne. Cette activation se fait de manière originale par rapport au mécanisme connu d'activation de

la voie canonique, car Tax possède un domaine de liaison directe avec le facteur p100. L'interaction de Tax avec p100 promeut le recrutement de la kinase IKK α au niveau du facteur p100, induisant ainsi sa phosphorylation suivie de sa dégradation partielle et de l'apparition du facteur p52 [Xiao et al., 2001].

L'importance fonctionnelle de cette activation de la voie alterne NF- κ B par Tax est longtemps restée floue. En effet, le fait que Tax-1 (codé par HTLV-1) soit capable d'activer cette voie alors que Tax-2 (codé par HTLV-2) ne puisse le faire suggère un potentiel rôle de cette voie dans l'induction de l'oncogenèse qui fait suite à l'infection par HTLV-1 alors qu'elle n'apparaît pas après infection par HTLV-2 [Higuchi et al., 2007, Higuchi and Fujii, 2009]. D'un autre côté, l'absence de détection de dimères p52/RelB dans des cellules ATL peut être interprétée comme un signe de l'absence d'implication de cette voie dans l'oncogenèse médiée par HTLV-1, bien que la situation des cellules ATL établies ne reflète pas avec exactitude les mécanismes de l'induction de la transformation [Mori et al., 1999]. D'autres travaux ont montré que l'inhibition de la voie alterne dans les cellules infectées par HTLV-1 provoquait un ralentissement de la tumorigenèse, passant par l'inhibition du suppresseur de tumeur WWOX (pour *WW domain-containing OXidoreductase*), lui-même un inhibiteur de la voie canonique NF- κ B [Fu et al., 2011]. Ainsi, l'activation de la voie alterne NF- κ B par Tax pourrait être un moyen de lever certains mécanismes cellulaires d'inhibition de la voie canonique, ces deux voies étant activées de manière coordonnée dans les cellules infectées par HTLV-1. D'autres études ont décrit l'activation de la voie alterne en contexte d'infection par HTLV-1, par la répression du miARN miR-31, inhibiteur du facteur NIK [Yamagishi et al., 2012].

B.4. Partenaires cellulaires de Tax impliqués dans la potentialisation de l'induction de la voie NF- κ B

a) Optineurine, TAX1BP1 et régulation de l'ubiquitination de Tax Il a été montré que Tax interagit avec divers facteurs, permettant le contrôle de sa propre ubiquitination. Notamment, il a été montré que Tax interagit avec les facteurs TAX1BP1 (pour *Tax-1 Binding Protein*) et OPTN/NRP (pour *Optineurine / NEMO-Related Protein*), deux régulateurs impliqués dans des mécanismes d'inhibition de la voie canonique NF- κ B dans des contextes autres que l'activation par Tax.

En effet, TAX1BP1 a été décrit comme un membre du complexe d'édition des chaînes de poly-ubiquitine A20. Ce complexe comprenant les facteurs TAX1BP1, Itch et RNF11 est porteur à la fois d'une activité de dé-ubiquitination et d'une activité E3-ligase, catalysant l'édition

de chaînes de poly-ubiquitine de type K63, remplacées par des chaînes de type K48, dont le potentiel dégradatif est élevé. Le complexe A20 est responsable de l'édition des chaînes de poly-ubiquitine portées par les facteurs RIP-1 et TRAF6 dans le contexte de l'induction de NF- κ B par le TNF- α et l'IL-1. La formation du complexe A20 est stimulée par la phosphorylation de TAX1BP1 médiée par IKK α (lors de l'activation de la voie alterne NF- κ B), constituant une boucle de rétro-contrôle négatif de l'activation de NF- κ B [Shembade et al., 2011]. De son côté, OPTN est connu comme un inhibiteur de l'activation de la voie canonique NF- κ B induite par le TNF- α , en entrant en compétition avec IKK γ pour l'interaction avec le facteur RIP-1 poly-ubiquitiné [Zhu et al., 2007].

Tax est capable d'interagir avec ces deux facteurs inhibiteurs et de détourner leur fonction, aboutissant ainsi à une promotion de l'activation de NF- κ B. Concernant OPTN, il a été montré que Tax interagit avec ce facteur de manière dépendante de son ubiquitination, et que l'OPTN une fois recruté sur les chaînes de poly-ubiquitine portées par Tax stabilise l'ubiquitination de Tax [Journo et al., 2009]. Concernant TAX1BP1, plusieurs effets sont associés à son recrutement par Tax. Tout d'abord, Tax est connu pour inhiber la phosphorylation de TAX1BP1, inhibant ainsi la formation du complexe inhibiteur A20 [Shembade et al., 2011, Pujari et al., 2015]. TAX1BP1 a également été décrit comme un facteur coopérant avec OPTN pour l'interaction avec Tax et la stabilisation de sa poly-ubiquitination [Journo et al., 2009] (Figure 1.19).

b) Partenaires cellulaires impliqués dans le recrutement membranaire de Tax

Nous avons déjà évoqué le recrutement de Tax au niveau de membranes contenant des radeaux lipidiques où il recrute les facteurs du complexe IKK [Huang et al., 2009]. Ce recrutement, pourtant connu de longue date, comporte encore de grandes zones d'ombres. En effet, la nature des membranes auxquelles Tax est recruté n'est pas clairement caractérisée, ce d'autant plus que cette zone est définie de manière assez large, englobant l'appareil de golgi et le centrosome [Harhaj et al., 2007, Kfoury et al., 2008]. La question de la nature de ces membranes sera discutée plus tard à la lumière des résultats obtenus dans le cadre du travail de thèse.

L'autre inconnue concerne le ou les facteurs à l'origine de ce recrutement membranaire de Tax. À ce jour, l'étude la plus convaincante sur ce point est celle décrivant le recrutement de Tax et de IKK γ par la protéine trans-membranaire CADM1 au niveau de radeaux lipidiques [Pujari et al., 2015] (Figure 1.19). Ce recrutement est fonctionnellement important pour l'activation de la voie NF- κ B et l'inhibition du complexe A20. Le fait que CADM1 soit initialement décrit avec une localisation à la membrane plasmique complexifie encore un peu plus la question

de la nature des membranes auxquelles Tax est recruté, mais les expériences fonctionnelles ne laissent que peu de doute quant à l'importance de ce facteur dans le recrutement de Tax aux radeaux lipidiques ainsi que dans l'activation de la voie NF- κ B qui en résulte.

Ainsi, nous avons vu que les partenaires de Tax et leur localisation cellulaire sont des questions d'importance pour comprendre en détail l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Dans ce contexte, la description récente des partenaires de Tax que sont OPTN et TAX1BP1 comme des récepteurs autophagiques nous a amené à revisiter leur rôle dans l'activation de la voie NF- κ B, enrichissant les réflexions liées à la régulation et à un possible échafaudage moléculaire de l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Au cours de cette étude, nous avons également été amenés à étudier les interactions entre Tax et p62, un autre récepteur autophagique appartenant à la même famille moléculaire, et plus généralement, les interactions fonctionnelles entre Tax et les voies de l'autophagie cellulaire.

V Relations entre l'autophagie, les récepteurs autophagiques et la voie NF- κ B

Nous allons maintenant nous pencher sur le contexte bibliographique permettant de comprendre en quoi l'interaction d'une protéine virale avec des facteurs décrits comme remplissant une fonction autophagique peut-être intéressante à étudier. Cette perspective sera considérée en abordant particulièrement les rôles de l'autophagie dans l'immunité innée anti-virale et dans la régulation de la voie NF- κ B. Nous allons tout d'abord préciser ces rôles, en nous penchant sur l'autophagie en tant que telle, avant de nous intéresser aux récepteurs autophagiques.

A. L'autophagie sélective : modalités et rôles biologiques

Les différentes voies autophagiques Le terme *Autophagie* provient du grec, signifiant *se manger soi-même*. Il s'agit en réalité d'un enchevêtrement de différentes voies cellulaires, regroupant chacune ses propres sous-voies. On distingue généralement trois grandes formes d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie, sur laquelle nous centrerons notre étude. Toutes ces voies ont en commun d'être des voies de dégradation cellulaire dépendantes du lysosome. Cette dégradation concerne généralement des composants cytosoliques et des organites, mais aussi occasionnellement des éléments exogènes. Elle peut être aléatoire ou sélective, constitutive ou induite par un stress cellulaire.

La microautophagie résulte d'une invagination directe de la membrane du lysosome, sans passage par une structure intermédiaire [De Duve, Christian and Wattiaux, 1966]. Cette invagination peut prendre en charge des éléments cytosoliques (on parle de tube autophagique), mais aussi des organites endommagés comme les peroxysomes, des régions du noyau ou encore des mitochondries [Sakai et al., 1998, Roberts et al., 2003, Kiššová et al., 2007]. Ce mécanisme peut être aléatoire ou sélectif, existe à l'état basal mais peut être activé par un stress cellulaire, notamment par la voie mTOR (pour *mammalian Target Of Rapamycin*) répondant principalement au stress métabolique [Dubouloz et al., 2005].

L'autophagie médiée par les chaperonnes (ou CMA, pour *Chaperones-Mediated Autophagy*), est également un mécanisme agissant directement à la surface du lysosome, mais qui a la particularité d'être exclusivement sélectif. La CMA concerne uniquement des protéines et des agrégats protéiques, dont la dégradation est extrêmement rapide [Dice et al., 1978]. Ce mécanisme, par ailleurs sensible au stress cellulaire, repose sur la linéarisation et la translocation directe de protéines dans le lysosome par l'intermédiaire d'un complexe protéique situé à la surface du lysosome, et comprenant des chaperonnes comme la protéine Hsc70. La sélectivité repose sur la reconnaissance d'une séquence consensus *[KFERQ]* portée par les protéines-cibles [Chiang and Dice, 1988].

La macroautophagie est quant à elle caractérisée par la formation de vésicules intermédiaires, appelées autophagosomes. Nous allons maintenant développer cette forme d'autophagie.

A.1. La macroautophagie

a) Historique de la découverte de la macroautophagie Il s'agit de la première forme d'autophagie décrite à la suite des premières utilisations de la microscopie électronique pour caractériser l'ultra-structure cellulaire au cours des années 1950 [Clark, 1957, Novikoff, 1959]. La macroautophagie comprend la formation de structures cytoplasmiques à double-membrane, ce qui en fait des constituants peu communs du paysage vésiculaire de la cellule. Selon la nomenclature établie par Christian De Duve dans les années 1960, ces vésicules sont nommées autophagosomes, et emprisonnent une fraction du cytoplasme en leur sein. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes, donnant naissance à des autophagolysosomes (ou autolysosomes), dont le contenu est dégradé (membrane interne incluse) [de Duve, 1963]. Ce mécanisme est aléatoire ou sélectif.

Rapidement, la dégradation d'organites a été mise en évidence, notamment de mitochondries dont la taille facilite les observations [Ashford and Porter, 1962]. Le phagophore, structure

à double membrane non-fermée qui donne naissance à l'autophagosome après élongation a ensuite été observé [Gordon and Seglen, 1988]. Enfin, la découverte de la conservation des voies autophagiques au sein des eucaryotes est à l'origine des premiers cribles permettant l'identification des gènes impliqués chez la levure [Tsukada and Ohsumi, 1993, Matsuura et al., 1997]. On compte aujourd'hui près de quarante gènes *atg* chez la levure [Klionsky, 2014]. Près d'une trentaine d'orthologues ont été décrits chez les mammifères. À partir de ces études, il a été possible de commencer à caractériser les mécanismes de la macroautophagie, dont nous proposons maintenant un rapide résumé.

b) Vue d'ensemble de la macroautophagie

Initiation L'initiation de la macroautophagie correspond logiquement à l'initiation de la formation du phagophore. Cette initiation est sous le contrôle de deux principaux complexes. Le premier est le complexe ULK (pour *Unc Like Kinase*), qui comprend les facteurs ULK1, ATG13, ATG101 et FIP200 (pour *FAK family kinase-Interacting Protein of 200 kDa*) [Ganley et al., 2009, Hara et al., 2008, Jung et al., 2009]. Le second est le complexe Beclin-1, composé des facteurs Beclin-1 (noté BECN1 dans la suite du texte), VPS34/PI3KC3 (pour *Vacuolar Protein Sorting / PhosphoInositide-3-Kinase Complex III*), ATG14, VPS15/p150 et Bif (ou *Endophilin B1*) [Itakura et al., 2008, Funderburk et al., 2010].

L'activité du complexe ULK est régulée par une série de phosphorylation inhibitrices et activatrices. Le facteur ULK1 est la cible de phosphorylations inhibitrices dont la disparition sous certaines conditions va induire l'activation du complexe ULK. La levée d'inhibition du facteur ULK1 va conduire à son auto-phosphorylation, ainsi qu'à la phosphorylation des facteurs ATG13 et FIP200 du complexe ULK. Ces modifications entraînent ensuite le recrutement du complexe Beclin-1 à proximité du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire du facteur AMBRA1 (pour *Activating Molecule In BECN1-Regulated Autophagy Protein 1*), lui-même phosphorylé par les kinases du complexe ULK [Fimia et al., 2007, Di Bartolomeo et al., 2010]. Le complexe Beclin-1 une fois recruté induit plusieurs modifications, dont la production de Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate (PI3P) sur la membrane du phagophore par l'activité de VPS34/PI3KC3 [Petiot et al., 2000, Kihara et al., 2001]. PI3P promeut ensuite le recrutement de protéines effectrices comme WIPI ainsi que des complexes d'élongation du phagophore (Figure 1.20). La nature du phagophore n'est pas encore clairement définie, comme nous le verrons plus tard.

Élongation L'élongation du phagophore est permise par l'apport de lipides et par le recrutement de complexes de conjugaison *ubiquitin-like*. L'apport de lipides n'est pas encore tout à fait déterminé, mais semble mettre en jeu le seul facteur ATG transmembranaire (ATG9) ainsi que le facteur WIPI [Young et al., 2006, Papinski et al., 2014]. À l'inverse, le fonctionnement des complexes de conjugaison est bien caractérisé. Leur fonctionnement est analogue au système d'ubiquitination où des enzymes E1, E2 et E3 se transfèrent successivement l'ubiquitine jusqu'à son substrat final (Figure 1.20). Le premier complexe se forme par activation des facteurs ATG12 (analogue de l'ubiquitine) et ATG7 (analogue à une enzyme d'activation E1) [Tanida et al., 2001]. ATG12 est ensuite lié aux facteurs ATG5 et ATG10 (analogue à une enzyme de conjugaison E2) [Mizushima et al., 1998, Nemoto et al., 2003]. Enfin, ATG12 et ATG5 sont liés au facteur ATG16 [Mizushima et al., 1998].

Le second de ces complexes met en jeu des membres de la famille ATG8, regroupant les 7 orthologues mammifères du facteur ATG8 présent chez la levure. Ces orthologues sont les protéines MAP-LC3 (pour *Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3*) LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C ainsi que les protéines GABARAP (pour *Gamma-AminoButyric Acid type A (GABA(A) Receptor-Associated Protein)*), GABARAPL1 et GABARAPL2 (pour *GABARAP-Like*). Parmi les membres de cette famille, le facteur LC3B est le plus étudié et nous nous intéresserons donc ici à ce facteur, appelé LC3 par la suite. LC3 est analogue de l'ubiquitine dans ce complexe, et se fixe à ATG7 (analogue à une enzyme d'activation E1), qui transfère LC3 au facteur ATG3 (analogue à une enzyme de conjugaison E2), avant de médier sa lipidation par conjugaison au phosphatidyléthanolamine (PE) puis l'enchâssement de LC3-PE à la membrane du phagophore (analogue au substrat final), faisant intervenir le complexe ATG5-ATG12-ATG16 (analogue à une E3-ligase) [Ichimura et al., 2000, Sakoh-Nakatogawa et al., 2013]. La forme lipidée de LC3 est appelée LC3-II, par opposition à la forme non-lipidée appelée LC3-I. La lipidation de LC3 est un marqueur classique de l'activation de l'autophagie [Klionsky, D. et al., 2015]. À la fin de l'élongation, l'autophagosome se forme par fermeture du phagophore.

Maturation L'autophagosome ainsi formé ne peut cependant pas réaliser la dégradation des éléments qu'il séquestre. La dégradation nécessite la poursuite du processus autophagique par la fusion de l'autophagosome avec un lysosome, qui constitue la maturation. Ces étapes conduisent à la dégradation du contenu de l'autophagosome. Maturation et dégradation constituent donc les dernières étapes du *flux autophagique*, défini comme l'ensemble des étapes aboutissant à la dégradation du cargo autophagosomal.

Ce mécanisme de fusion est encore peu connu, notamment s'agissant de sa régulation spatio-temporelle qui empêche la fusion d'autophagosomes non-fermés. Les autophagosomes sont d'ailleurs également capables de fusionner avec des endosomes, ce qui donne naissance à des amphisomes. Le caractère facultatif ou non du passage par l'amphisome dans la maturation est encore largement débattu, surtout depuis la parution d'études montrant un empêchement de la maturation par l'inhibition de la fusion entre les autophagosomes et les endosomes [Tumbarello et al., 2012]. La question de la maturation autophagique est intimement liée à celle de la régulation du trafic vésiculaire, et de nombreux acteurs de ce trafic sont à l'œuvre, notamment les RabGTPases et les SNARE.

Les RabGTPases sont responsables du recrutement de protéines adaptatrices et de facteurs de mobilité vésiculaire à la membrane des autophagosomes [Bhuin and Roy, 2014]. En particulier, le facteur Rab7 semble jouer plusieurs rôles importants pour la maturation, notamment en médiant le recrutement de FYCO1 (pour *FYVE and COiled-coil containing domain 1*), permettant le transport antérograde des autophagosomes via l'interaction avec les kinésines [Pankiv et al., 2010]. Le processus de recrutement de Rab7 est encore mal caractérisé, mais il semble mettre en jeu PI3P. Comme cité précédemment, le complexe Beclin-1 est donc impliqué dans cette étape, par la production de PI3P par VPS34. En particulier, le complexe composé des facteurs BECN1, VPS34, VPS15 et UVRAG (pour *UV Radiation resistance Associated Gene protein*) est impliqué dans la maturation, UVRAG stimulant la production de PI3P par VPS34.

Les SNARE (pour *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor*), quant à elles, sont des protéines situées à la surface des vésicules, gouvernant la fusion entre elles. Cette fusion nécessite l'interaction entre un complexe R-SNARE (pour *Arginine-SNARE* anciennement *Vesicle-SNARE*) à la surface du compartiment donneur et Q-SNARE (pour *Glutamine-SNARE* anciennement *Target-SNARE*) à la surface du compartiment receveur. En particulier, le complexe Q-SNARE Syntaxine-17 semble jouer un rôle crucial. Syntaxine-17 est recruté à la membrane des autophagosomes après leur fermeture et est impliqué dans la fusion avec le lysosome par recrutement de la Q-SNARE SNAP29 et l'interaction avec la R-SNARE VAMP8 (pour *Vesicle-Associated Membrane Protein*) [Itakura et al., 2012].

Enfin, notons le rôle primordial des protéines de mouvement du cytosquelette. Nous avons évoqué l'importance des protéines de mouvement associées aux microtubules, mais l'actine est également impliquée [Aplin et al., 1992, Köchl et al., 2006]. Un rôle important a notamment été mis en évidence pour le moteur myosine VI [Tumbarello et al., 2012].

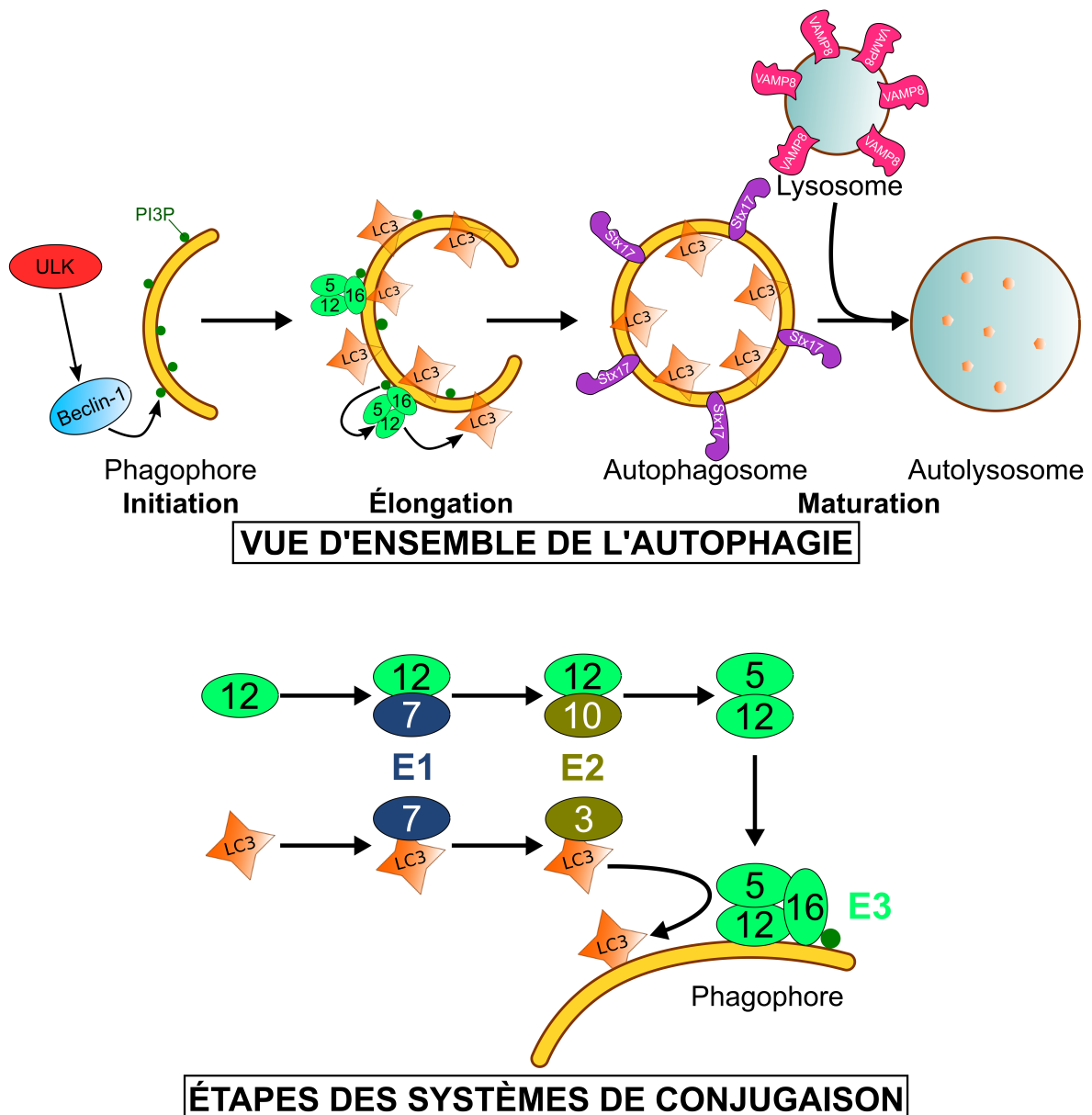


FIGURE 1.20 – Vue d’ensemble des étapes du processus autophagique et de ses systèmes de conjugaison

L’autophagie est composée de trois étapes successives (panel haut), l’initiation de la formation des membranes autophagiques sous le contrôle des complexes ULK et Beclin-1, l’élancement du phagophore qui s’accompagne de la lipodation du facteur LC3 et enfin la maturation qui consiste en la fusion entre l’autophagosome et le lysosome, résultant en la dégradation des éléments présents à l’intérieur des autophagosomes.

La bonne marche du flux autophagique repose sur le recrutement de deux complexes de conjugaison *ubiquitin-like* à la membrane du phagophore. Le premier système aboutit à la formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16, recruté *via* PI3P sur le phagophore. Le second système aboutit à la lipodation et à l’enchâssement de la protéine LC3 sur la phagophore, dont la conjugaison est promue par le complexe ATG5-ATG12-ATG16.

Stx17 = Syntaxin-17; les facteurs figurés uniquement par des chiffres sont tous des facteurs ATG.

c) **Voies cellulaires régulant la macroautophagie** La régulation de la macroautophagie implique de nombreux systèmes de détection du stress cellulaire. Si historiquement le stress principalement étudié est le manque de nutriments, les ROS, les signaux apoptotiques ainsi que le stress réticulaire sont également impliqués [Jung et al., 2010, Kroemer et al., 2010]. L'intégration des signaux de stress passe par trois structures de contrôle principales, le complexe TORC1, la famille Bcl-2 (pour *B-cell lymphoma-2*) et la voie AMPK (pour *AMP-activated Protein Kinase*).

Le complexe TORC1 comprend notamment les kinases mTOR et RAPTOR. En contexte basal, ce complexe est recruté à la membrane des lysosomes par les RagGTPases sous le contrôle du complexe RAGULATOR [Sancak et al., 2008, Sancak et al., 2010]. Une fois recruté, TORC1 médie la phosphorylation inhibitrice de ULK1, empêchant la formation des membranes autophagiques [Hosokawa et al., 2009, Jung et al., 2009, Kim et al., 2011]. Diverses conditions de stress cellulaire, comme le stress nutritif provoquent une baisse du recrutement des RagGTPases par RAGULATOR, induisant une baisse de la phosphorylation de ULK1 qui s'active et déclenche la voie que nous avons vue précédemment.

La voie AMPK complète la régulation du complexe TORC1 en fonction des nutriments. En effet, AMPK catalyse la phosphorylation inhibitrice de TORC1 [Gwinn et al., 2008]. Or, l'activité de la kinase AMPK est positivement régulée par l'AMP (Adénosine Mono Phosphate), qui est inversement proportionnel au niveau énergétique de la cellule. En condition de faible niveau énergétique, le ratio $\frac{AMP}{ATP+ADP}$ augmente, ce qui promeut l'activité de l'AMPK, résultant en l'inhibition de TORC1, potentialisant l'activation de ULK1 et l'initiation du phagophore. AMPK est également capable de catalyser directement la phosphorylation activatrice de ULK1 en condition de jeûne glucidique [Kim et al., 2011].

La famille Bcl-2, quant à elle, régule le complexe Beclin-1. Les facteurs anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-X_L se fixent au facteur BECN1, empêchant sa liaison avec VPS34 [Patingre et al., 2005]. Le complexe Beclin-1 est activé en condition de stress apoptotique, les facteurs pro-apoptotiques comme BNIP3 (pour *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) entrant en compétition avec Bcl2/Bcl-X_L pour la fixation à BECN1. Une fois libéré, BECN1 peut lier et activer VPS34 [Patingre et al., 2005, Maiuri et al., 2007]. Une autre régulation possible passe par la kinase JNK1 (pour *c-Jun N-terminal protein Kinase-1*) stimulant la phosphorylation de Bcl2/BclX_L, ce qui inhibe leur liaison à BECN1 [Wei et al., 2008]. Enfin, la kinase DAPK (pour *Death Associated Protein Kinase*) est également capable d'interagir avec BECN1 et de phosphoryler ce dernier, provoquant sa libération de Bcl2/Bcl-X_L [Levin-Salomon et al.,

2014].

d) La question de l'origine du phagophore Une fois définies globalement les voies de régulation de l'initiation et de l'élongation du phagophore, reste la question de l'origine de ces membranes. Cette question, apparue très tôt historiquement est encore très débattue actuellement [Lamb et al., 2013]. Rapidement, l'hypothèse de l'émergence à partir d'un autre organite s'est imposée. Mais la nature de cet organite reste floue, et pour cause, ce sont probablement plusieurs compartiments cellulaires qui coopèrent pour aboutir à cette formation. Sur la base, entre autres, d'identification de protéines spécifiques du réticulum à la surface du phagophore, la source principale semble se situer au niveau de domaines particuliers du réticulum endoplasmique, appelés omégasomes [Dunn, 1994]. D'autres sources comme les membranes réticulaires associées aux mitochondries (MAM pour *Mitochondria-Associated-Membranes*), certaines membranes golgiennes ou même la membrane plasmique ont été décrites [Shibutani and Yoshimori, 2014]. Le modèle semble se complexifier encore, avec l'implication d'autres compartiments, semblant remplir des fonctions spécifiques. Notamment, le compartiment intermédiaire situé entre l'appareil de Golgi et le réticulum (ou ERGIC, pour *Endoplasmic Reticulum - Golgi Intermediate Compartment*) semble être, en plus d'un pourvoyeur potentiel de membrane, un *point chaud* de lipodation du facteur LC3 [Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006, Ge et al., 2013, Ge et al., 2015].

Le modèle proposé actuellement permettant de concilier toutes ces hypothèses composites décrit la participation des différents compartiments à des étapes bien précises de la formation de l'autophagosome. Ainsi, les omégasomes réticulaires pourraient se former sous l'influence de facteurs recrutés au niveau des MAM. Les membranes golgiennes, voire même plasmiques (par l'intermédiaire des endosomes) pourraient ensuite constituer des sources membranaires secondaires participant à l'élongation [Lamb et al., 2013, Shibutani and Yoshimori, 2014].

A.2. La macroautophagie sélective

Nous avons cité l'existence de mécanismes aléatoires ou spécifiques de la macroautophagie. La macroautophagie sélective désigne l'ensemble des sous-voies non-aléatoires de la macroautophagie. Cette sélectivité repose principalement sur l'étape d'élongation du phagophore, et du contrôle des éléments cytosoliques autour desquels s'effectue cette élongation. Ces éléments, (ci-après dénommés *substrats*), peuvent être de nature diverse, comme des mitochondries, peroxysomes, agrégats protéiques, fractions du réticulum endoplasmique, bactéries intracellulaires

ou encore des facteurs viraux. La nature du substrat permet de distinguer les différents sous-types d'autophagie sélective que nous décrirons plus loin. Nous allons maintenant voir quelles sont les bases moléculaires de cette sélectivité, ainsi que les différentes sous-catégories de la macroautophagie sélective.

a) Les récepteurs autophagiques, acteurs moléculaires de la sélectivité autophagique

Les récepteurs autophagiques sont responsables de la sélectivité autophagique. Ils sont capables d'interagir à la fois avec un membre de la famille LC3 situé à la membrane des phagophores, et avec les substrats autophagiques [Johansen and Lamark, 2011]. Cette double liaison permet de guider l'élongation du phagophore autour du substrat ciblé, ce qui résulte en la fermeture de l'autophagosome autour de ce substrat. De manière intéressante, des expériences utilisant des systèmes de reconstitution *in vitro* ont permis d'observer que l'autophagosome ne contient aucun autre composé cytosolique, faisant émerger le concept d'*autophagie exclusive* [Johansen and Lamark, 2014]. Une fois séquestré à l'intérieur de l'autophagosome, le substrat ciblé spécifiquement par les récepteurs autophagiques est entraîné dans la voie autophagique, et finit par être dégradé, et le récepteur subit cette dégradation avec sa cible.

Cette fonction de recrutement de substrats à la membrane du phagophore se traduit par des propriétés structurales communes à tous les récepteurs autophagiques. En particulier, ils présentent tous un domaine de liaison aux facteurs de la famille LC3 (domaine LIR, pour *LC3-Interacting Region*), permettant la liaison au phagophore. Le domaine LIR canonique suit une séquence du type $\Theta\text{XX}\Gamma$ (avec Θ un résidu aromatique et Γ un résidu hydrophobe) [Johansen and Lamark, 2011]. Cependant, de plus en plus de domaines LIR spécifiques à certains membres de la famille LC3 (comme le CLIR, spécifique LC3C), voire non-canoniques (parfois appelés pseudo-LIR) sont décrits, apportant un niveau de complexité supplémentaire [Verlhac et al., 2015].

L'un des premiers récepteurs autophagiques à avoir été décrit est le facteur Sequestosome1/p62 (ou SQSTM1/p62, que nous appellerons simplement p62 en ces lignes). Ce récepteur est capable de lier spécifiquement certains substrats en reconnaissant les chaînes d'ubiquitine qui leur sont conjuguées [Pankiv et al., 2007]. De manière intéressante, des données récentes montrent que p62 est également capable de lier des substrats de manière ubiquitine-indépendante, comme le transactivateur Tat du virus HIV-1 ou la capsid du virus Sindbis, bien que le domaine de p62 mis en jeu n'ait pas été identifié [Orvedahl et al., 2010, Sagnier et al., 2015]. Plusieurs récepteurs autophagiques lient leurs substrats de la même manière que p62 et

partagent de fortes similarités de séquence, ainsi qu'une histoire évolutive commune [Svenning and Johansen, 2013, Tumbarello et al., 2015]. Ces facteurs sont regroupés au sein d'une famille, appelée famille SLR (pour *Sequestosome-Like Receptors*). Nous allons maintenant nous pencher sur les caractéristiques de cette famille.

b) L'archétype p62 La protéine Sequestosome-1/p62 est l'archétype de la famille des *Sequestosome-Like Receptors* à laquelle elle donne son nom. Initialement, p62 a été identifié comme une protéine dont l'inactivation constitue un facteur génétique de risque dans le développement de la maladie osseuse de Paget, caractérisée par un développement osseux hypertrophique et peu résistant [Hocking et al., 2002]. P62 forme des oligomères riches en chaînes d'ubiquitine, appelés corps p62, qui se sont avérés être des agrégats de protéines ubiquitinés dont certains sont localisés aux autophagosomes [Bjørkøy et al., 2005]. La présence de p62 est nécessaire pour la formation de ces corps cytosoliques et pour leur localisation aux autophagosomes [Bjørkøy et al., 2005]. Il a été montré que p62 est capable de lier le facteur LC3, ce qui promeut sa propre dégradation par l'autophagie, permettant de caractériser p62 en tant que récepteur autophagique [Pankiv et al., 2007].

Cette protéine de 440 acides aminés comporte de nombreux domaines d'interactions protéiques. En plus de son domaine LIR, permettant sa liaison à LC3 et son domaine UBA permettant l'interaction avec les chaînes d'ubiquitine, on lui connaît un domaine KIR, permettant la liaison au facteur Keap-1 (pour *Kelch-like ECH-associated protein 1*), un domaine de liaison au facteur TRAF6, ainsi qu'un domaine PB1 (pour *Phox and Bem1*), médiant de nombreuses interactions protéiques homophiliques, notamment des homo-oligomérisations de p62 [Johansen and Lamark, 2011]. P62 possède également une région d'interaction au zinc (ZZ), permettant de lier le facteur RIPK1 (pour *Receptor-Interacting Protein Kinase 1*), ainsi qu'un domaine d'interactions multiples (MIR, pour *Multiple Interaction Region*) sur lequel nous reviendrons ultérieurement [Sanz et al., 1999] (Figure 1.21).

P62 est un médiateur notamment des processus d'agrégation et de xénophagie sur lesquels nous reviendront ultérieurement [Pankiv et al., 2007, Kim et al., 2008, Zheng et al., 2009].

c) Les membres de la famille SLR et leurs fonctions autophagiques

Présentation des SLR et considérations évolutives La famille de récepteurs autophagiques SLR compte aujourd'hui cinq membres : p62, NBR1 (pour *Neighbor of BRCA1 gene*

1 protein), NDP52 (pour *Nuclear Dots Protein 52 kDa*), TAX1BP1 et OPTN. Tous ces récepteurs présentent des domaines communs : au minimum un domaine permettant la liaison à l'ubiquitine (UBA, UBAN - *Ubiquitin Binding in ABIN and NEMO* ou UBZ - *Ubiquitin-Binding ZnF*), un domaine LIR et d'autres domaines d'interactions protéiques [Svenning and Johansen, 2013]. Ainsi, on peut trouver dans la structure des SLR des domaines *Coiled-Coil*, PB1, ZZ, SKICH (pour *Skeletal muscle and Kidney-enriched Inositol phosphatase Carboxyl Homology*) et FW (pour *Four Tryptophan*) (Figure 1.21). La comparaison de ces domaines fait émerger un certain nombre de ressemblances, et l'hypothèse de relations évolutives entre certains de ces récepteurs.

Les études évolutives réalisées sur la famille SLR font émerger trois sous-groupes : un premier comprenant NDP52 et TAX1BP1, un second regroupant p62 et NBR1 et le dernier comprenant uniquement OPTN. NDP52 et TAX1BP1 sont très proches, et sont apparus lors de la duplication des gènes CALCOCO (pour *CALcium-binding and COiled-COil domain-containing protein*) coïncidant avec l'émergence des vertébrés [Tumbarello et al., 2015]. OPTN quant à lui, est très proche de la protéine NEMO/IKK γ avec lequel il partage un unique orthologue avant leur divergence [Tumbarello et al., 2015]. Cette unique séquence orthologue est décrite jusqu'aux cionnes, et sa duplication se situe également au moment de l'émergence des vertébrés [Tumbarello et al., 2015].

p62 et NBR1 semblent évolutivement plus anciens, et leur histoire est complexe. NBR1 et ses orthologues sont reconnaissables par leur *domaine NBR1*, caractérisé par la présence de quatre tryptophanes, également appelé "FW", pour "*Four Tryptophan*". Sur la base de cette distinction, il est possible de distinguer les orthologues de NBR1 et ceux de p62. Les orthologues de NBR1 sont les seuls présents chez les unicellulaires, au sein de la lignée verte et chez les choanoflagellés, même s'il existe des duplications occasionnelles dans certaines percolozoaires. De son côté, p62 est présent seul chez la majorité des protostomiens, à l'exception de certains chélicérates qui possèdent NBR1 et p62, tout comme chez les deutérostomiens [Svenning et al., 2011, Kraft et al., 2010]. Cette complexité exclut l'hypothèse d'un unique événement de duplication suivi de divergence. L'histoire évolutive ainsi décrite montre que la présence d'au moins un orthologue de NBR1 ou p62 revêt une importance sélective. Cette importance est d'ailleurs mise en lumière par l'étude de l'orthologue de NBR1 chez *A. thaliana*, qui présente des fonctions en lien avec l'autophagie et ayant des propriétés fonctionnelles hybrides entre celles de NBR1 et de p62 [Svenning et al., 2011].

Cette histoire évolutive fait sens au regard des domaines partagés par certains SLR, et peut

servir de base à la réflexion sur les propriétés fonctionnelles présomptives de certains membres de cette famille (Figure 1.21).

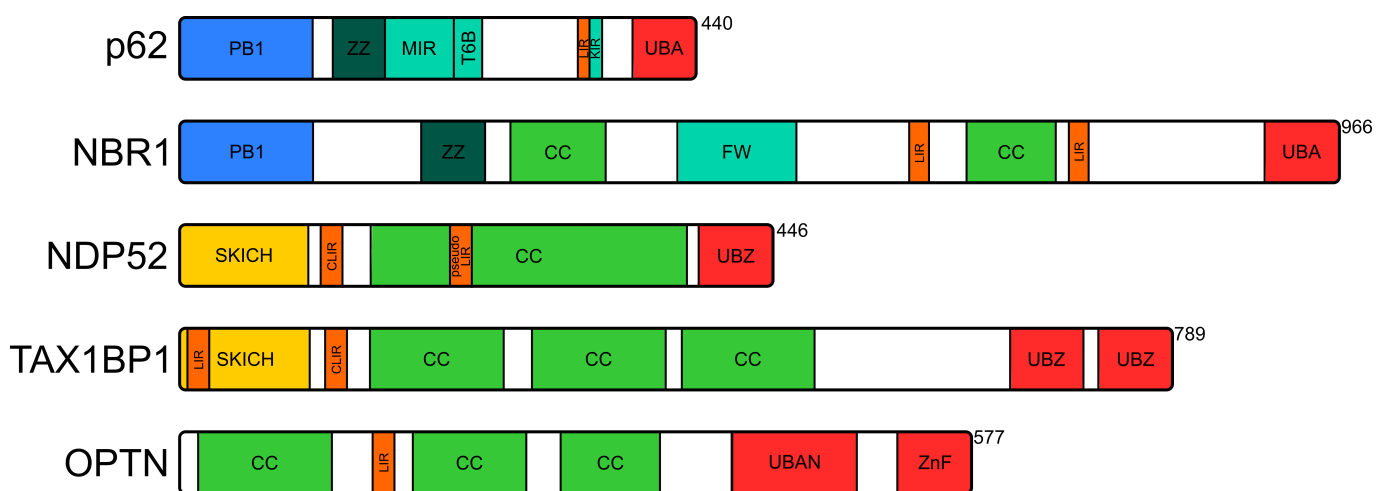


FIGURE 1.21 – La famille des Sequestosome-Like Receptors

Les facteurs de la famille SLR sont les récepteurs autophagiques les mieux décrits à l'heure actuelle. Tous les membres de cette famille comportent des domaines de liaison à des facteurs de la famille LC3 (LIR *LC3-Interacting Region*, CLIR *LC3C-Interacting Region* ou pseudo-LIR, en orange), ainsi que des domaines de liaison aux chaînes d'ubiquitine (UBA *UBiquitin-Associated*, UBAN *Ubiquitin Binding in ABIN and NEMO*, UBZ *Ubiquitin-Binding ZnF* ou doigt à zinc, en rouge). De nombreux SLR comportent également un ou plusieurs domaines CC (*Coiled-coil* en vert clair).

PB1 : *Phox and Bem1* ; ZZ : domaine d'interaction au zinc ; MIR : *Multiple Interaction Region* ; KIR : *Keap-1 Interaction Region* ; SKICH : *Skeletal muscle and Kidney-enriched Inositol phosphatase Carboxyl Homology* .

Les SLR, base de la sélectivité autophagique Tous les SLR sont impliqués dans divers processus de dégradation autophagique sélective, avec quelques variations fonctionnelles [Johansen and Lamark, 2011]. Ainsi, NBR1 est principalement un effecteur impliqué dans la dégradation d'agrégats protéiques et dans la dégradation des peroxysomes, appelée pexophagie [Kirkin et al., 2009a, Deosaran et al., 2013]. De son côté, OPTN, décrit récemment, est surtout connu pour son rôle anti-bactérien et dans la dégradation de mitochondries [Wild et al., 2011, Lazarou et al., 2015]. NDP52 est également impliqué dans la dégradation de bactéries intracellulaires et de mitochondries [Thurston et al., 2009, Lazarou et al., 2015]. Quand à TAX1BP1, il est pour l'heure surtout connu pour son rôle anti-bactérien [Tumbarello et al., 2015]. La famille des SLR regroupe ainsi des récepteurs essentiels de l'arsenal autophagique sélectif cellulaire. Mais cette importance fonctionnelle ne doit pas masquer l'existence d'autres fonctions, autophagiques ou non-autophagiques, pour certains SLR.

Implication des SLR dans la maturation autophagique La première fonction divergente de la reconnaissance autophagique est l'implication dans la maturation autophagique. En effet, les récepteurs autophagiques ont longtemps été considérés, par définition, comme des facteurs permettant uniquement la reconnaissance des substrats autophagiques, mais sans intervenir sur le flux. Cette restriction fonctionnelle a disparu suite à de récents travaux montrant que le récepteur NDP52 promeut la maturation autophagique [Verlhac et al., 2015]. Cette fonction de NDP52 repose sur son interaction avec le moteur moléculaire myosine VI qui a lieu à l'extérieur des autophagosomes. En interagissant d'une part avec la myosine VI et de l'autre avec les protéines de la famille LC3 situés sur la face externe des autophagosomes (*via* un domaine pseudo-LIR), NDP52 semble promouvoir le trafic des autophagosomes, et ainsi leur maturation [Verlhac et al., 2015]. Un mécanisme similaire a été décrit concernant son proche paralogue TAX1BP1, également capable de promouvoir la maturation autophagique par l'interaction avec la myosine VI [Tumbarello et al., 2015]. Récemment, l'OPTN a également été décrit comme un régulateur de la maturation, qui se trouve être également un interactant déjà connu de la myosine VI [Verlhac, 2016, Sahlender et al., 2005].

d) Vue d'ensemble des principales voies macroautophagiques sélectives

Mitophagie La mitophagie est l'un des premiers phénomènes autophagiques observés chez la levure. Ce processus permet à la fois la dégradation de mitochondries endommagées,

mais aussi la dégradation de mitochondries fonctionnelles au cours de certaines étapes du développement, comme l'érythropoïèse, aboutissant à la production d'hématies caractérisées notamment par l'absence de mitochondries. Les premières étapes post-fécondation sont également caractérisées par un processus de mitophagie, responsable de la dégradation des mitochondries apportées par le spermatozoïde [Al Rawi et al., 2011].

Concernant le mécanisme responsable de la dégradation des mitochondries endommagées, il repose sur la stabilisation du facteur PINK1 à la membrane mitochondriale, provoqué notamment par la perte de potentiel membranaire [Matsuda and Tanaka, 2010, Narendra et al., 2010]. PINK1 permet le recrutement du facteur Parkin à la membrane mitochondriale, ainsi que l'activation de son activité E3-ubiquitine ligase, ayant pour résultat l'accumulation de chaînes de poly-ubiquitine à la surface de la mitochondrie puis sa prise en charge par les récepteurs autophagiques NDP52 et OPTN [Lazarou et al., 2015] (Figure 1.22).

Agréphagie L'agrégation est un processus de l'autophagie sélective crucial pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, car il permet la dégradation des agrégats protéiques, décrits dans le cadre de nombreuses maladies dégénératives. Ces agrégats sont généralement ubiquitinés, ce qui promeut leur dégradation autophagique par le biais des récepteurs p62 et NBR1 [Bjørkøy et al., 2005, Pankiv et al., 2007, Kirkin et al., 2009b] (Figure 1.22).

L'existence de phénomènes d'amplification de l'action de ces récepteurs est notable. Par exemple, p62 est capable de recruter la protéine Alfy (pour *Autophagy-linked FYVE*), recrutant les facteurs ATG5-ATG12, qui pourrait ainsi jouer le rôle de plateforme d'assemblage des autophagosomes durant l'agrégation [Clausen et al., 2010].

Xénophagie La xénophagie est un processus macroautophagique de dégradation des éléments étrangers à la cellule, notamment des pathogènes intracellulaires ou certains de leurs composants. La xénophagie concerne donc à la fois les bactéries intracellulaires et les virus (comme le Sindbis virus, noté SINV). Ces pathogènes sont reconnus principalement par les facteurs p62, OPTN et NDP52, par interaction directe ou dépendante de l'ubiquitine [Jo et al., 2013] (Figure 1.22). Ainsi, la macroautophagie sélective constitue un mécanisme immunitaire inné à part entière, intervenant très précocement au niveau intracellulaire. Nous allons maintenant explorer plus en profondeur les implications de la xénophagie dans le contexte de l'infection virale.

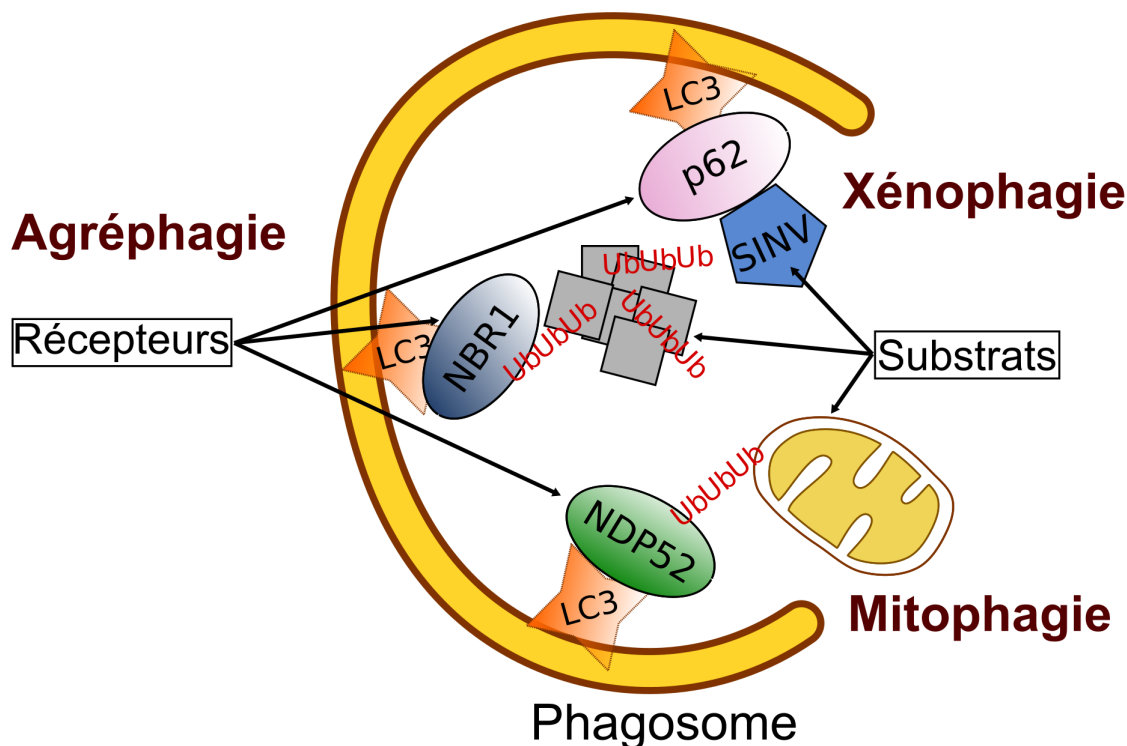


FIGURE 1.22 – Bases moléculaires de la sélectivité autophagique

Les principales voies de l'autophagie sélective sont la xénophagie, l'agréphagie et la mitophagie. Les cibles de chacune de ces voies sont recrutées de façon spécifique au niveau du facteur LC3 par l'intermédiaire d'un récepteur autophagique, par des interactions directes ou par la reconnaissance de chaînes d'ubiquitine.

SINV = capsid du virus Sindbis

e) Xénophagie et immunité anti-virale

Inhibition xénophagique de la réplication virale Si les bactéries intracellulaires peuvent être dégradées en intégralité par les voies xénophagiques, la prise en charge de particules virales entières semble assez rare. La plupart du temps, la xénophagie est à l'origine de la dégradation de certains facteurs viraux particuliers. Parmi les exemples classiques, on peut citer le SINV. Cet alphavirus à l'origine d'une arbovirose et infectant principalement le système nerveux central est une cible de la xénophagie. La protéine de capsid du SINV est reconnue par le récepteur p62, dans ce qui semble être une interaction directe, et la capsid est ensuite dégradée [Orvedahl et al., 2010]. Cette dégradation est porteuse d'un effet protecteur sur les cellules, et une inhibition expérimentale de l'autophagie aggrave la létalité du virus.

De très nombreux exemples pourraient être cités pour montrer l'importance de la dégradation autophagique dans la lutte anti-virale. Parmi ces exemples, le cas du virus de la fièvre

de la vallée du Rift (RVFV pour *Rift Valley Fever Virus*) semble particulièrement intéressant. En effet, dans le cas de l'infection par cet arbovirus appartenant au genre des Phlébovirus, un mécanisme autophagique capable d'inhiber la réplication virale a été décrit dans les cellules humaines, ainsi que dans les cellules d'insectes [Moy et al., 2014]. Un autre arbovirus, le virus du Chikungunya, est également ciblé par une action autophagique anti-virale du récepteur p62 chez l'Homme comme chez la souris [Judith et al., 2013]. Cela prouve la conservation du rôle de la xénophagie dans la lutte anti-virale au sein des métazoaires [Sumpter and Levine, 2011].

Échappement viral à la dégradation xénophagique Conséquence indirecte de l'ancienneté et de l'importance fonctionnelle des interactions entre xénophagie et virus, de nombreux cas d'échappement viral aux voies autophagiques ont été décrits. Couramment, les virus échappant à la xénophagie inhibent les étapes de maturation des autophagosomes, soit en inhibant la fusion avec les lysosomes, comme c'est le cas lors de l'infection par le δ -rétrovirus HTLV-1, soit en interférant avec la maturation de ces lysosomes, dans le cas de l'infection par le virus HBV [Tang et al., 2013, Liu et al., 2014]. Alternativement, certains virus peuvent intervenir sur des étapes plus précoces, notamment en inhibant la formation des autophagosomes. C'est le cas du virus Herpes Simplex de type I (HSV-I), capable d'inhiber l'activité de BECN1 [Orvedahl et al., 2007]. Dans le cas du virus HIV-1, la protéine virale Vif interagit avec le facteur LC3B, inhibant ainsi la formation des autophagosomes [Borel et al., 2015].

Manipulation des voies autophagiques par les virus Au-delà du simple échappement, certains virus sont capables de manipuler les processus autophagiques à leur bénéfice. Certains virus ont la capacité de détourner les membranes autophagiques et de les utiliser pour faciliter leur assemblage, comme cela semble être le cas avec le virus de la Dengue, autre arbovirus appartenant au genre Flavivirus [Mateo et al., 2013]. Le virus EBV détourne le flux autophagique, ce qui promeut l'adressage des particules virales à la membrane plasmique [Granato et al., 2014]. Dans certains cas, des facteurs autophagiques comme LC3 sont impliqués dans la réplication virale, comme c'est le cas dans le cadre de l'infection par le virus Influenza A [Beale et al., 2014]. Dans cet exemple, la protéine M2 du virus Influenza A provoque, via son domaine LIR, le recrutement de LC3 à la membrane plasmique qui résulte en la production de particules virales plus stables, en intervenant potentiellement sur l'apport de lipides utilisés

lors de l'assemblage viral.

Il arrive parfois qu'il y ait en parallèle un échappement et une promotion de l'autophagie, résultant en une augmentation de la survie cellulaire. Cette activation semble pourtant n'avoir aucun impact négatif sur la réplication de certains virus. Ce genre de mécanisme a été décrit dans le cadre de l'infection par Influenza A, qui est capable d'inhiber la fusion entre autophagosomes et lysosomes par le biais de sa protéine M2 [Gannagé et al., 2009, Zhirnov and Klenk, 2013]. Ce dernier exemple illustre bien la complexité pouvant exister dans les interactions entre les virus et l'autophagie. Si l'activation et l'inhibition de l'autophagie peuvent sembler contradictoires au sein d'une même cellule, il convient d'avoir à l'esprit l'aspect spatio-temporel de ces interactions. En effet, il est tout à fait imaginable d'activer de manière globale la formation des membranes autophagiques, en agissant au niveau des complexes d'initiation par exemple, tout en inhibant la dégradation, en agissant cette fois-ci spécifiquement au niveau des autophagosomes prenant en charge des éléments viraux, et uniquement ceux-ci. Ce genre de mécanisme est à l'heure actuelle très difficile à élucider avec les outils techniques disponibles.

L'exemple d'Influenza A nous amène à des cas plus complexes où l'autophagie semble jouer un rôle ambivalent, à la lumière des éléments dont nous disposons actuellement. Nous nous limiterons ici à deux exemples, ceux du Chikungunya et du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type I (HIV-1). Nous avons cité le ciblage du Chikungunya par le récepteur p62, mais l'interaction de la protéine non-structurale nsP2 avec le récepteur humain NDP52 promeut la réplication virale, montrant que le Chikungunya est capable de détourner certains récepteurs autophagiques à son profit [Judith et al., 2013]. Le virus HIV-1 est capable d'échapper à la dégradation autophagique dans les macrophages, via le facteur auxiliaire Nef [Kyei et al., 2009]. Cet échappement est couplé à un détournement puisque les membranes autophagiques semblent être utilisées lors de la réplication du virus, l'accumulation de membranes LC3-positives s'accompagnant d'une augmentation de la production virale dans les macrophages. En parallèle, dans ces mêmes cellules, la protéine Gag de HIV-1 interagit avec LC3, ce qui promeut la maturation virale [Kyei et al., 2009]. De plus, l'autophagie est impliquée dans l'apoptose des lymphocytes T non-infectés déclenchée par l'interaction entre le récepteur CXCR4 et l'enveloppe du HIV, qui est l'un des mécanismes aboutissant au déclenchement de la phase SIDA [Espert et al., 2006]. En opposition à ces effets plutôt pro-viraux et pathogènes, HIV-1 provoque une augmentation du flux autophagique dans les lymphocytes, cellules dans lesquelles le facteur transactivateur Tat est dégradé sous contrôle de p62, constituant un effet ant-viral de l'autophagie [Wang et al., 2012, Sagnier et al., 2015]. Les interactions entre le HIV-1 et l'autophagie sont donc complexes,

impliquent de nombreux facteurs viraux et cellulaires, et semblent varier en fonction du type cellulaire concerné.

A.3. Interactions entre HTLV-1 et l'autophagie sélective

Les premiers rapports faisant état d'interactions entre un virus HTLV et l'autophagie ont été réalisés en étudiant le virus HTLV-2 lors de l'infection de cellules T CD4⁺, sous-type cellulaire minoritaire lors de l'infection par HTLV-2, connu pour cibler principalement les cellules CD8⁺. L'infection par HTLV-2 s'accompagne d'une activation de l'autophagie cellulaire dans les cellules T CD4⁺ mémoires, ce qui promeut leur survie et participe à leur immortalisation [Ren et al., 2012]. Ces résultats ont été confirmés pour l'infection par HTLV-1, qui promeut l'autophagie, conférant ainsi une résistance à la mort apoptotique médiée par les récepteurs de mort [Wang et al., 2014]. Il a également été montré que l'infection par HTLV-1 provoque une accumulation d'autophagosomes, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la production virale, suggérant une possible inhibition des étapes tardives de la dégradation autophagique par le virus [Tang et al., 2013].

Les bases moléculaires de ces interactions semblent impliquer principalement le facteur Tax. Il a en effet été montré que Tax était capable de recruter certains membres du complexe Beclin-1, comme Bif, VPS34/PI3KC3 et BECN1 au niveau de membranes péri-golgiennes [Ren et al., 2015]. Ce recrutement semble dépendant des kinases IKK et induit la formation de membranes LC3-positives (Figure 1.23). Il semble donc que Tax soit capable d'induire la formation de membranes autophagiques, ce qui promeut la survie cellulaire, probablement au travers de l'effet de l'autophagie sur le maintien de l'homéostasie et de la survie cellulaire [Cheng et al., 2012].

L'induction de l'autophagie par Tax a été démontrée de manière directe. Mais de nombreux éléments suggèrent que cette activation pourrait être multi-factorielle. En effet, il est connu que la fraction cytosolique de p53 inhibe l'autophagie, en interférant avec le complexe ULK par interaction avec le facteur FIP200 [Tasdemir et al., 2008, Morselli et al., 2011]. Ainsi, l'inhibition de p53 par Tax pourrait être un mécanisme parmi d'autres d'activation générale du flux autophagique. D'autres mécanismes peuvent être envisagés, comme le fait que le complexe A20, inhibé par Tax, soit un inhibiteur de l'activité de BECN1 [Shi and Kehrl, 2010].

L'accumulation des autophagosomes est également liée à Tax, capable d'inhiber la maturation des autophagosomes en bloquant la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes [Tang et al., 2013] (Figure 1.23). De manière intéressante, cette étude montre que la stabilité de Tax

est promue par l'inhibition chimique de l'autophagie obtenue par traitement à la Bafilomycine A1 (notée BFA1). Cela montre que l'inhibition de la dégradation autophagique par Tax augmente sa propre stabilité, et suggère donc que Tax est une cible de l'autophagie. HBZ semble également avoir un effet inhibiteur sur l'autophagie, passant par l'activation de la voie mTOR, qui inhibe l'activation autophagique [Mukai and Ohshima, 2014].

Ainsi, le bilan des avancées sur la question suggère que Tax est capable de promouvoir le flux autophagique de manière générale, ce qui promeut la survie cellulaire, et est capable en parallèle d'inhiber la maturation des autophagosomes. Comme nous l'avons vu précédemment, si ces deux dynamiques peuvent sembler contradictoires, il est possible de les concilier en imaginant que Tax soit à l'origine d'une inhibition spécifique de la maturation des autophagosomes auxquels il est lui-même recruté, comme cela est suggéré par l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur sa propre stabilité. Pour autant, la présence de Tax au niveau des autophagosomes n'a pas été décrite, et les mécanismes précis par lesquels il inhibe la fusion entre autophagosomes et lysosomes restent inconnus. Nous allons maintenant voir en particulier quelles sont les relations entre l'autophagie et la voie NF- κ B en contexte basal, puis en présence de Tax.

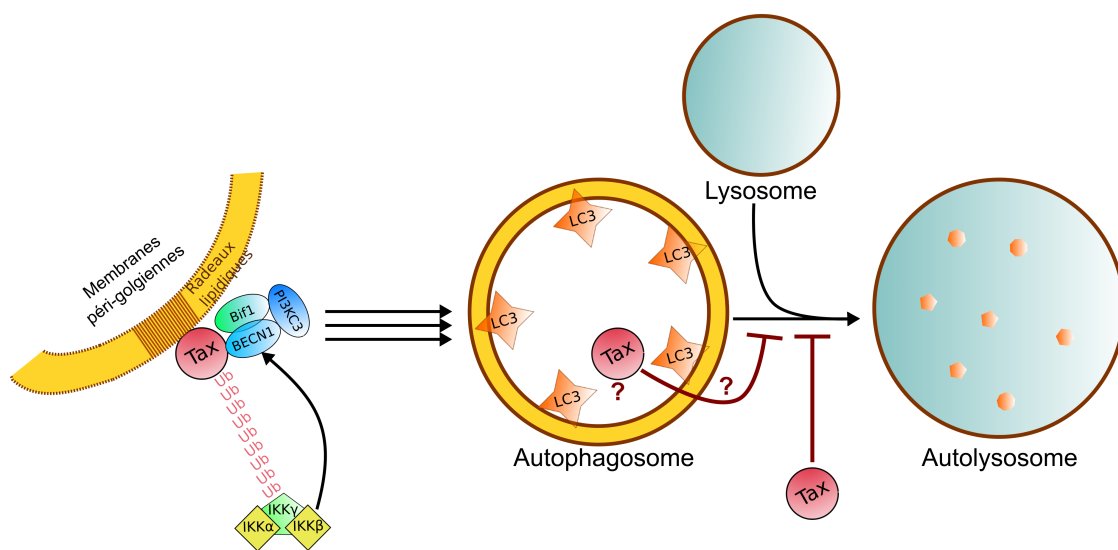


FIGURE 1.23 – Effets de Tax sur le flux autophagique

En médiant le recrutement de certains éléments du complexe Beclin-1 au niveau des radeaux lipidiques péri-golgiens, Tax promeut la formation d'autophagosomes. En parallèle, Tax est capable d'inhiber la maturation autophagique en interférant avec la fusion autophagosome-lysosome, sans que le mécanisme exact de cette inhibition soit connu. La question de la présence de Tax au niveau des autophagosomes reste sans réponse à l'heure actuelle.

B. Relations entre l'autophagie et la signalisation NF- κ B

Les relations entre l'autophagie et la signalisation NF- κ B sont nombreuses. Si l'on peut attendre d'une voie de régulation cellulaire au spectre aussi large que la voie NF- κ B qu'elle ait un effet sur de nombreux mécanismes en lien avec l'homéostasie cellulaire comme l'autophagie, l'influence inverse existe également [Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011]. La régulation de voies de signalisation cellulaire par l'autophagie constitue une thématique de recherche en développement, qui montre que l'autophagie est capable de réguler diverses voies. Comme nous le verrons par la suite, la plupart des ces effets reposent sur la dégradation d'un régulateur de la voie concernée.

B.1. Régulation de l'autophagie par la voie NF- κ B et ses médiateurs

La voie NF- κ B a été décrite comme un régulateur potentiellement positif et négatif de l'autophagie [Baldwin, 2012]. Par exemple, le dimère effecteur p65-p50 de la voie NF- κ B canonique peut, selon le contexte, promouvoir l'autophagie en activant l'expression du facteur BECN1 (testé en conditions d'activation des cellules T) ou réprimer l'autophagie en inhibant l'expression du facteur pro-apoptotique et pro-autophagique Bnip3 (testé en sur-expression de p65) [Copetti et al., 2009, Shaw et al., 2008]. Cette régulation semble généralement dépendante du contexte d'induction de la voie NF- κ B. Ainsi, la voie NF- κ B promeut l'autophagie en réponse à un choc de température ou en condition d'hypoxie [Nivon et al., 2009, Martinez-Outschoorn et al., 2010]. À l'inverse, l'activation de la voie NF- κ B par le TNF α réprime l'autophagie en provoquant une activation du facteur mTOR notamment [Djavaheri-Mergny et al., 2006, Djavaheri-Mergny et al., 2007]. Dans certains contextes infectieux, comme lors de l'infection prolongée de macrophages par la bactérie *E. coli*, NF- κ B inhibe également l'autophagie [Schlottmann et al., 2008] (Figure 1.24).

En parallèle, les médiateurs intermédiaires de la voie NF- κ B sont également directement impliqués dans la régulation de l'autophagie, principalement de manière activatrice. Citons notamment les effets des kinases IKK indépendants de NF- κ B sur l'autophagie. Ces kinases participent à l'activation des voies AMPK et JNK notamment, deux potentiateurs autophagiques [Criollo et al., 2009, Criollo et al., 2010]. Les facteurs TAB2/3 interfèrent également avec l'autophagie, qu'ils répriment en se liant au facteur BECN1. Le recrutement de TAB2/3 lors de l'activation de la voie canonique NF- κ B provoque la libération de BECN1, ce qui participe à l'induction de l'autophagie [Criollo et al., 2011, Niso-Santano et al., 2012]. Les derniers

exemples que nous venons de lister montrent que la régulation de l'autophagie en lien avec la voie NF- κ B ne se limite pas à un simple effet transcriptionnel médié par NF- κ B. Il existe en effet de nombreux points de croisement entre les différentes voies de signalisation cellulaires activant NF- κ B et les voies d'activation de l'autophagie.

Les relations précises entre l'autophagie et la voie NF- κ B dans les cellules exprimant la protéine virale Tax restent peu étudiées. Toutefois, nous avons vu que le recrutement de BECN1 par Tax, et l'activation de la formation de membranes autophagiques qui en résulte sont dépendants des facteurs IKK [Ren et al., 2015]. Cela suggère que Tax oriente au moins partiellement la voie NF- κ B vers un rôle activateur de l'autophagie.

B.2. Régulation de la voie NF- κ B par l'autophagie

En miroir, l'autophagie régule la voie NF- κ B, avec différents effets déjà décrits, notamment par le biais des propriétés dégradatives de l'autophagie. La dégradation de l'inhibiteur I κ B α promeut l'activation de la voie NF- κ B dans un contexte d'activation par le TNF α , et la répression génétique de l'autophagie inhibe cette activation, suggérant que cette étape de dégradation n'est pas facultative [Colleran et al., 2011, Criollo et al., 2012]. Dans ce contexte d'activation, la dégradation autophagique de I κ B α semble gouverner l'induction à long terme de la voie NF- κ B, là où l'induction précoce repose sur la dégradation de l'inhibiteur par le protéasome [Colleran et al., 2011]. L'autophagie participe également à la séquestration de l'inhibiteur A20 dans les macrophages [Kanayama et al., 2015] (Figure 1.24).

Parallèlement, la dégradation de médiateurs activateurs de la voie NF- κ B a également été décrite. Citons notamment la dégradation autophagique de la kinase IKK β qui est induite par la mono-ubiquitination de cette kinase par l'E3-ubiquitine ligase TRIM21 (pour *TRIPartite Motif-containing protein 21*) [Niida et al., 2010]. En absence de la chaperone Hsp90 (pour *Heat shock protein 90 kDa*), les kinases activatrices IKK et NIK subissent une dégradation autophagique, inhibant donc les voies canoniques et alternes de NF- κ B [Qing et al., 2006, Yan et al., 2007, Qing et al., 2007].

Concernant l'implication de l'autophagie dans l'activation de NF- κ B médiée par Tax, il a été montré que le facteur BECN1, ainsi que ATG5 participent à l'activation de la voie NF- κ B dans le contexte de l'infection par HTLV-1 [Chen et al., 2015]. Cette étude est pour l'instant la seule à démontrer l'importance de l'autophagie dans cette activité de Tax.

Nous constatons donc que Tax intervient dans la régulation de la voie NF- κ B médiée par l'autophagie. Or nous avons déjà vu que certains SLR portent des fonctions variées, qui ne se

limitent pas à la reconnaissance de substrats autophagiques. En particulier, de nombreux SLR jouent un rôle dans la régulation de la voie NF- κ B, et sont donc d'intérêt dans le contexte de l'expression de Tax par les cellules infectées.

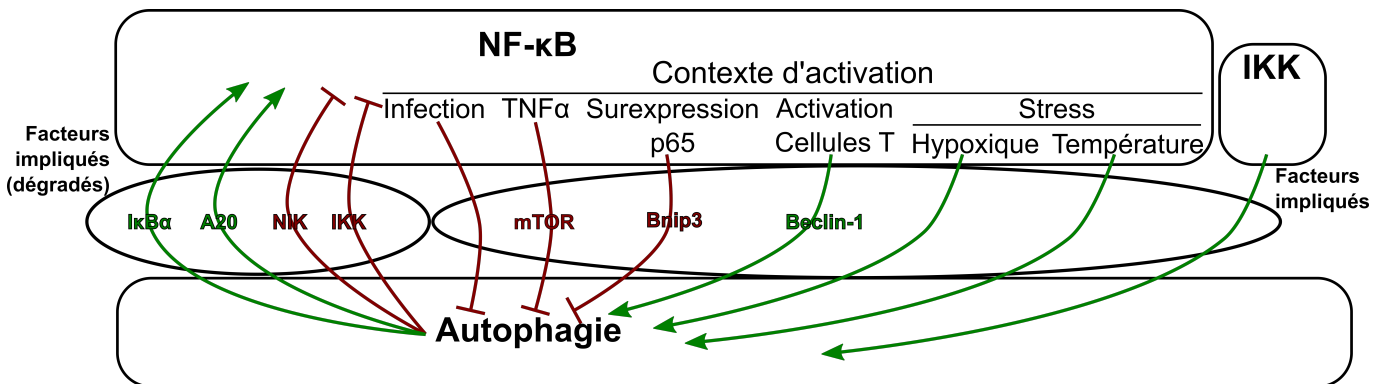


FIGURE 1.24 – Interactions fonctionnelles entre la voie NF- κ B et l'autophagie cellulaire

La complexité des interactions fonctionnelles entre les voies NF- κ B et l'autophagie est figurée ici symboliquement. Chacune de ces deux voies est décrite à la fois comme un potentiateur et un inhibiteur de la seconde, de manière dépendante du contexte cellulaire et du type d'activation de la voie NF- κ B.

Inspiré de [Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011]

C. Relations entre les SLR et la voie NF- κ B en contexte non-infectieux

Les rôles d'OPTN et TAX1BP1 ayant déjà été abordés précédemment, et aucun rôle indépendant de l'autophagie n'ayant à ce jour été décrit pour NDP52 et NBR1, nous allons nous intéresser particulièrement au récepteur p62.

L'effet activateur de la voie NF- κ B médié par le récepteur p62 a très vite été identifié pour son implication dans la maladie osseuse de Paget, où la perte de fonction de p62 entrave la bonne maturation des ostéoclastes, normalement obtenue par une activation de NF- κ B [Layfield and Hocking, 2004]. Depuis, le rôle de p62 a été décrit dans de nombreux contextes d'activation de la voie NF- κ B sous le contrôle de récepteurs. L'activation de la voie NF- κ B gouvernée par la réception de l'IL-1 et du TNF α , deux voies concernant les lymphocytes T, implique p62 [Sanz et al., 2000, Zotti et al., 2014]. P62 est également nécessaire pour l'activation prolongée de NF- κ B dans les lymphocytes T_{H2} [Martin et al., 2006]. Toutes les données concernant l'implication de p62 dans l'activation des lymphocytes T montrent que p62 est requis pour l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules T effectrices. Ce facteur est également impliqué dans d'autres voies

d'activation de NF- κ B, comme la voie du NGF (pour *Nerve Growth Factor*) ou l'activation du CD40 dans les macrophages [Wooten et al., 2001, Seibold and Ehrenschwender, 2015].

Du point de vue mécanistique, p62 est un partenaire du facteur TRAF6, impliqué comme nous l'avons vu dans de nombreux processus d'activation de la voie NF- κ B, ainsi que des facteurs RIP1 et aPKC [Sanz et al., 1999]. Cette interaction entre p62 et TRAF6 semble impliquée dans tous les exemples que nous venons de citer. Le mode d'action de p62 sur NF- κ B implique notamment la manipulation de l'ubiquitination. P62 promeut l'activité E3-ubiquitine ligase de TRAF6 et l'ubiquitination subséquente de IKK γ nécessaire au recrutement de IKK β [Wooten et al., 2005, Moscat et al., 2007]. Il a été suggéré que p62 est capable d'interagir avec IKK γ , participant à la promotion de son ubiquitination par TRAF6 [Zotti et al., 2014]. Un mode d'action parallèle proposé pour p62 passe par la structuration de plateformes de recrutement de divers effecteurs de la voie NF- κ B, comme les facteurs PKC, par l'intermédiaire de la protéine Ajuba, interagissant avec p62 par son domaine MIR [Feng and Longmore, 2005].

Plus récemment, p62 a été décrit comme un médiateur crucial de la formation des signalosomes cytosoliques POLKADOTS impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules T [Paul et al., 2014]. Cette structuration des POLKADOTS par p62 est potentiellement liée à la formation par p62 d'oligomères fibrillaires capables d'agrèger des chaînes d'ubiquitine, impliquées dans la formation des POLKADOTS [Ciuffa et al., 2015]. La relation entre p62 et l'activation de NF- κ B dans les cellules T n'est pas à sens unique, puisque p62 est également responsable de la dégradation autophagique du facteur Bcl10, composant majeur de ces mêmes signalosomes [Paul et al., 2012]. Ainsi, p62 est impliqué dans la régulation fine de la voie NF- κ B dans ces cellules, en étant associé à la fois à l'induction et à l'inhibition de la formation des signalosomes. Les mécanismes gouvernant le passage d'un effet à l'autre n'ont, pour l'heure, pas été décrits [Paul and Schaefer, 2013] (Figure 1.25). Cette fonction de p62 dans la signalisation en jouant le rôle de facteur d'échafaudage moléculaire avait déjà été mise en évidence dans un autre cas, celui de la régulation de la signalisation apoptotique dépendante de la caspase-8, où les médiateurs apoptotiques sont recrutés par p62 à la surface des autophagosomes, qui jouent donc un rôle de plateforme de signalisation [Young et al., 2012]. Ce dernier exemple pose particulièrement la question du lien entre le rôle de p62 dans la signalisation et son rôle comme récepteur autophagique, et montre que faire une dichotomie entre les différents rôles de SLR est une simplification probablement excessive.

Les relations entre les SLR, et notamment p62, avec la voie NF- κ B sont donc nombreuses, complexes, et potentiellement encore à explorer. Ces relations sont décrites ici en contexte non-

infectieux, mais des cas de manipulation de la voie NF- κ B par le ciblage de p62 ont déjà été décrits, comme dans le cas du clivage de p62 par la protéase B3 du virus Coxsackie, provoquant la répression de NF- κ B [Shi et al., 2013]. Dans le contexte de l'infection par HTLV-1, aucune étude n'a pour l'instant porté sur les potentielles interactions fonctionnelles avec les récepteurs p62, NBR1 et NDP52.

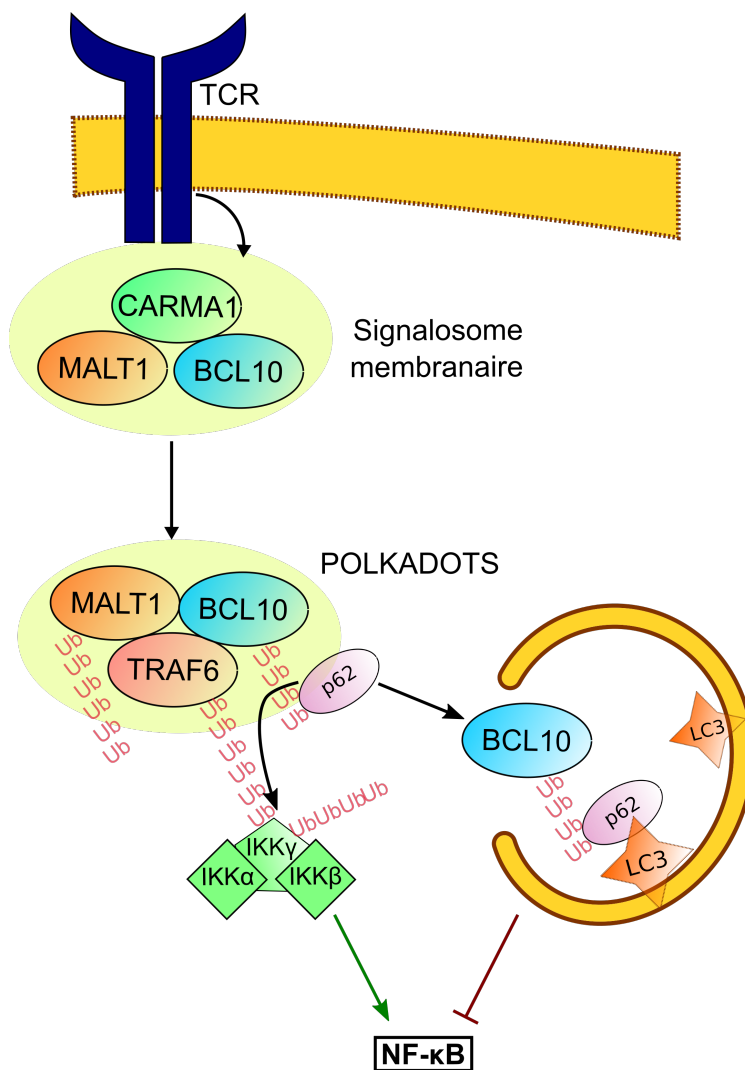


FIGURE 1.25 – Régulation de l'activation de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T par p62

Schéma adapté du modèle établi par l'équipe de Brian Schaefer [Paul and Schaefer, 2013]

VI Problématique du travail de thèse

L'objectif principal de notre équipe est d'étudier les mécanismes de l'oncogenèse dans le contexte de l'infection par le virus HTLV-1. Un effort particulier a été porté à l'étude des modalités d'activation constitutive de la voie NF- κ B médiée par Tax. Les travaux précédents effectués au sein de l'équipe ont notamment démontré l'implication des facteurs cellulaires OPTN et TAX1BP1 dans cette activation [Journo et al., 2009]. Ces deux facteurs potentialisent de manière synergique l'activation de NF- κ B par Tax, notamment par la stabilisation de l'ubiquitination de Tax médiée par OPTN. Ces travaux s'inspirent de l'étude des premiers rétrovirus oncogènes, en utilisant le modèle HTLV-1 afin de mieux comprendre les mécanismes de signalisation cellulaire, même en-dehors de tout contexte viral, et confirment, avec d'autres études, l'intérêt de l'étude de Tax pour mieux comprendre la biologie cellulaire.

Dans ce contexte, la récente description des partenaires de Tax, OPTN et TAX1BP1 comme des récepteurs autophagiques membres de la famille des SLR soulève un potentiel paradoxe dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax. En effet, ces partenaires potentiateurs, pro-viraux, sont également décrits comme prenant part à un mécanisme généralement anti-viral : l'autophagie sélective. Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a été d'explorer les relations entre la fonction de Tax sur la voie NF- κ B et ses relations avec la machinerie autophagique, par l'intermédiaire des récepteurs autophagiques. Nous avons donc cherché à caractériser les possibles interactions fonctionnelles entre Tax et d'autres récepteurs membres de la famille des SLR dans le contexte de l'activation de la voie NF- κ B. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de p62, représentant d'un sous-groupe évolutif parmi les SLR qui n'avait pas encore été étudié dans ce contexte.

(NB : Pour plus de détails sur les procédures expérimentales, se référer à l'annexe correspondante)

CHAPITRE 2

Résultats

I Description et caractérisation de l'interaction entre Tax et p62

Les éléments cités précédemment nous ont amenés à considérer l'hypothèse d'une interaction entre Tax et les membres de la famille SLR. L'étude de p62 semblait particulièrement intéressante évolutivement parlant, car il s'agit d'un représentant du seul sous-groupe évolutif pour lesquels les interactions avec Tax n'ont pas été étudiées. Le rôle connu de p62 dans la signalisation de la voie NF- κ B rend également ce facteur intéressant pour notre étude.

A. Mise en évidence d'une interaction entre Tax et p62

a) Mise en évidence en cellules de lignée HeLa Nous avons donc tout d'abord réalisé des expériences d'immuno-précipitations pour tester l'hypothèse d'une interaction entre Tax et p62. Dans un premier temps, nous avons immuno-précipité spécifiquement la protéine p62 endogène dans des lysats cellulaires de lignée HeLa exprimant la construction Tax-His (Figure 2.1A). Cette construction de Tax sera utilisée dans la suite des expériences, l'étiquette simplifiant l'expérience tout en conservant les fonctions de Tax. Après immunoblot ciblant p62 et l'étiquette His (fixée à Tax), la protéine Tax est détectée spécifiquement dans les conditions où p62 est immuno-précipité (IP : p62) et non dans les conditions contrôles utilisant un anticorps non-spécifique de la même espèce (IP : IgG). Ainsi, cette expérience montre que Tax interagit avec p62 endogène dans ces conditions expérimentales.

b) Interaction dans des lignées chroniquement infectées par HTLV-1 L'interaction entre Tax et p62 a ensuite été testée dans diverses lignées cellulaires dérivées de lymphocytes de patients, qui sont des cellules chroniquement infectées par le virus HTLV-1 et conservées en culture depuis. Les lignées C8166, Hut102 et C91PL ont été testées. Ces trois lignées diffèrent notamment par leur niveau de Tax chroniquement exprimé, les C8166 et Hut102 exprimant plus de Tax que les C91PL. Les C8166, en plus de leur forte expression de Tax, sont caractérisées par une absence de production de particules virales infectieuses [Sodroski et al., 1984].

Ces trois lignées ont donc toutes subi une immuno-précipitation avec des anticorps spécifiques de p62 (Figure 2.1B, ligne supérieure). Après précipitation de p62, la détection de Tax par un anticorps spécifique est observée pour ces trois lignées. Après précipitation de Tax, la protéine p62 peut également être détectée dans la lignée C8166 (Figure 2.1B, ligne inférieure). Ces résultats confirment que Tax et p62 interagissent dans ces lignées chroniquement infectées

par HTLV-1. Après OPTN et TAX1BP1, nous avons donc mis en évidence par ces expériences l'interaction entre Tax et un troisième membre de la famille des SLR.

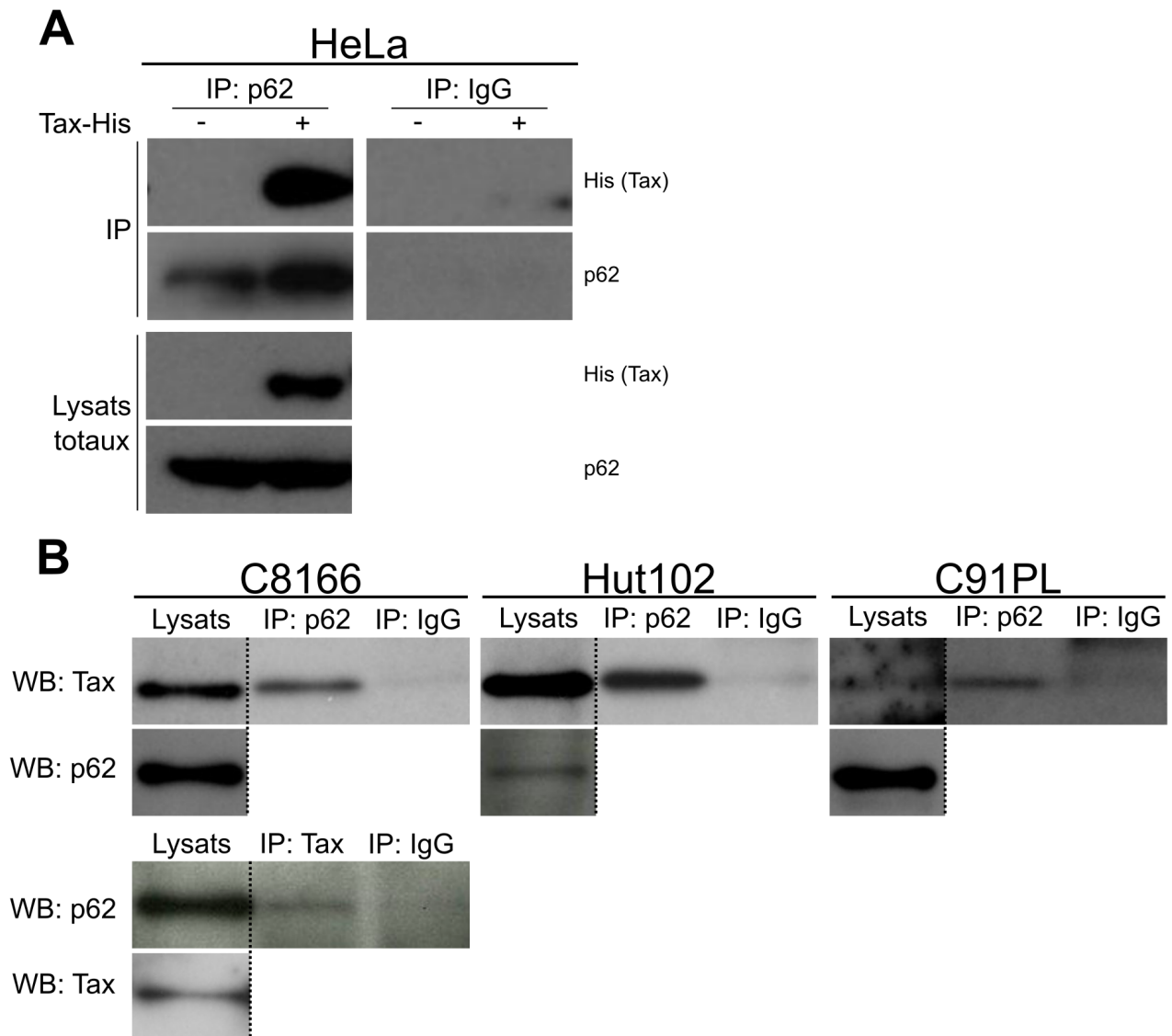


FIGURE 2.1 – Tax et p62 interagissent en cellules HeLa ainsi qu'en lignées chroniquement infectées par HTLV-1

(A) Des cellules HeLa transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His ont été lysées avant de subir une immuno-précipitation spécifique de p62 (IP : p62) ou aspécifique (IP : IgG). Après lavages, les extraits ont été analysés par immunoblots spécifiques de p62 et de l'étiquette His. (B) Des cellules des lignées chroniquement infectées par HTLV-1 C8166, Hut102 et C91PL ont été lysées avant de subir une immuno-précipitation spécifique de p62 (IP : p62) ou aspécifique (IP : IgG). Après lavages, les extraits ont été analysés par immunoblots spécifiques de p62 et de Tax (**ligne supérieure**). Dans le cas des C8166, des immuno-précipitations spécifiques de Tax ont également été réalisées, suivies par des immunoblots spécifiques de p62 et Tax (**ligne inférieure**).

B. Caractérisation de l'interaction entre Tax et p62

a) Indépendance vis-à-vis de l'ubiquitination de Tax Bien que ce ne soit pas systématique, la plupart des interactions réalisées par des SLR impliquent la reconnaissance de chaînes d'ubiquitine par un domaine de reconnaissance, comme le domaine UBA de p62. Notamment, il a été montré que l'interaction entre Tax et OPTN est dépendante de l'ubiquitination de Tax [Journo et al., 2009]. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une implication de l'ubiquitination de Tax dans cette interaction.

Différents mutants de lysine de Tax ont été utilisés dans des expériences d'immuno-précipitation (Figure 2.2 A). Les mutants Tax-K4-8R et Tax-K0 ont été décrits comme non-ubiquitinables, aucun de ces deux mutants n'étant capable d'activer pleinement la voie NF- κ B [Chiari et al., 2004, Lamsoul et al., 2005, Nasr et al., 2006]. Ces deux mutants sont également incapables d'interagir avec OPTN [Journo et al., 2009]. De manière surprenante, après précipitation de p62 endogène en cellules de la lignée HeLa, les mutants Tax-K4-8R et Tax-K0 sont toujours détectés. La spécificité de cette interaction a été vérifiée en utilisant la construction virale HBZ-His comme contrôle, qui n'est pas détectée après précipitation de p62. Ces résultats suggèrent fortement que l'ubiquitination de Tax n'intervient pas dans cette interaction.

Pour confirmer cette observation, nous avons voulu vérifier si le domaine UBA de p62 était impliqué dans son interaction avec Tax. Dans ce cadre, nous avons utilisé un mutant de p62 portant une délétion de sa région carboxy-terminale contenant le domaine UBA (délétion à partir de la position 385). Pour réaliser cette expérience, ce sont des cellules déficientes (*KO*) pour le gène p62 qui ont été utilisées. En effet, p62 étant capable de former des oligomères, il est possible que la protéine ectopique p62 Δ UBA se retrouve en complexes avec Tax par l'intermédiaire de formes endogènes sauvages de p62, qui feraient le pont entre Tax et p62 Δ UBA. L'utilisation de cellules MEF p62^{-/-} (obtenues auprès de l'équipe du Dr. Yanagawa de l'Université de Tsubuka, Japon) permet d'éliminer cette possibilité (Figure 2.2 B). Ce faisant, la précipitation des formes Myc-p62 non-délétées (notées FL pour *Full Length*) et Myc-p62 Δ UBA dans des extraits de cellules MEF p62^{-/-} exprimant Tax-His aboutit à la détection de Tax même en présence de la forme de p62 délétée de son domaine d'interaction à l'ubiquitine. Cela confirme le caractère ubiquitine-indépendant de l'interaction entre Tax et p62.

Pour compléter cette étude, d'autres mutants fonctionnels de Tax ont été caractérisés, notamment les mutants M22 (défectif pour l'activation de NF- κ B), M47 (défectif pour la transactivation provirale par le facteur CREB) ainsi que deux mutants du domaine PBM (T351A

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

et V353A) (Figure 2.2C et D). Aucun de ces mutants ne montre de diminution significative de l'interaction avec p62 endogène, ce qui signifie que l'interaction entre Tax et p62 est indépendante à la fois de l'ubiquitination de Tax, du domaine PBM de Tax et de sa capacité à interagir fonctionnellement avec les voies NF- κ B et CREB.

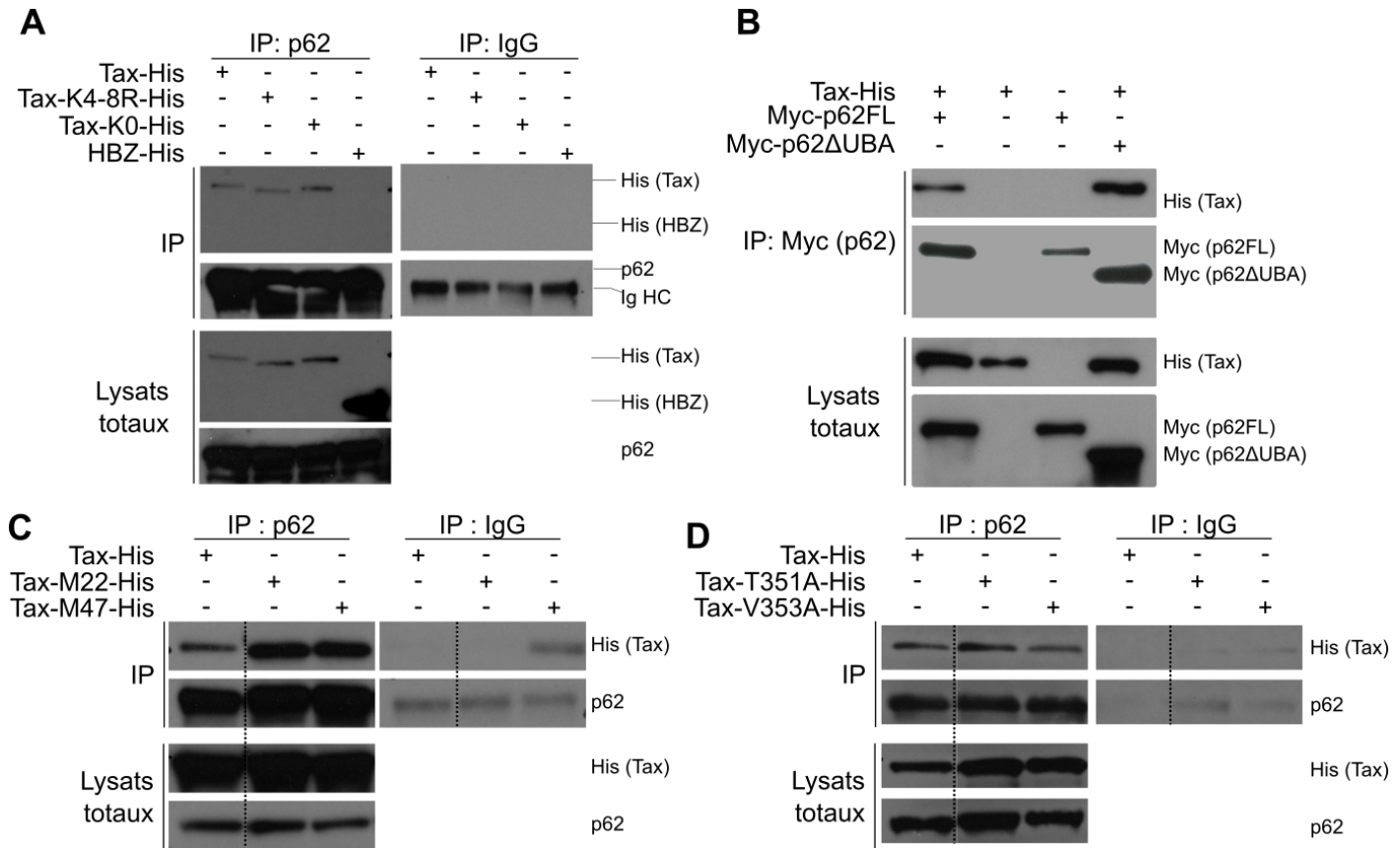


FIGURE 2.2 – L'interaction entre Tax et p62 est indépendante de l'ubiquitination de Tax et du domaine PBM

(A) Des cellules HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expression des facteurs Tax et HBZ sauvages ou des mutants de lysine de Tax, Tax-K4-8R et Tax-K0. Toutes ces constructions portent l'étiquette His. Après lyse, les extraits cellulaires ont subi des immuno-précipitations spécifiques de p62 (IP : p62) ou aspécifiques (IP : IgG). Après lavages, les extraits ont été analysés par immunoblots spécifiques de p62 et de l'étiquette His (*Ig HC*, chaînes lourdes d'immunoglobulines). (B) Des cellules MEF KO pour le gène p62 ont été transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ainsi qu'un vecteur d'expression de p62 FL ou du mutant p62ΔUBA (déléte du domaine d'interaction à l'ubiquitine). Les constructions de p62 contiennent toutes l'étiquette Myc. Après immuno-précipitation spécifique de l'étiquette Myc, les extraits ont été analysés par immunoblots spécifiques des étiquettes His et Myc. (C, D) Des cellules HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expression des facteurs Tax sauvages ou des mutants M22 (déficient pour l'activation de NF-κB), M47 (déficient pour la transactivation provirale par CREB) (C) ou T351A et V353A (deux mutants du domaine PBM de Tax) (D). Toutes ces constructions portent l'étiquette His. Après lyse, les extraits cellulaires ont subi des immuno-précipitations spécifiques de p62 (IP : p62) ou aspécifiques (IP : IgG). Après lavages, les extraits ont été analysés par immunoblots spécifiques de p62 et de l'étiquette His.

b) Cartographie du domaine d'interaction à Tax au sein de la protéine p62 Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de l'interaction entre Tax et p62, nous avons cherché à cartographier le domaine de p62 impliqué dans cette interaction. Pour ce faire, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr. Johansen à l'Université Arctique de Tromsø (Norvège), dirigeant la première équipe à avoir caractérisé les fonctions autophagiques de p62 [Bjørkøy et al., 2005]. En réalisant des expériences de *GST-pulldown*, nos collaborateurs ont tout d'abord obtenu la confirmation d'une interaction directe entre Tax et p62 (Figure 2.3A).

Suite à cette confirmation, la cartographie du domaine de p62 interagissant avec Tax a été réalisée, tout d'abord en réalisant des expériences de *GST-pulldown* en utilisant des mutants de délétion de p62 couvrant toute la séquence de p62, avec notamment des mutants délétés des domaines PB1, ZZ et UBA (Figure 2.3B et C). Ces résultats montrent que le domaine 170-256 de p62 est impliqué dans l'interaction avec Tax. Afin de caractériser plus finement ce domaine, des expériences de *MBP-pulldown* ont été réalisées en utilisant des mutants de délétion et des fragments de p62 correspondant à cette région (Figure 2.3B et D). Ces résultats montrent que la délétion de la région 170-221 de p62 suffit à abroger l'interaction avec Tax, là où le fragment 170-206 de p62 est capable d'interagir seul avec Tax. Ces données convergent vers la conclusion que le domaine MIR (*Multiple Interacting Region*) de p62 correspond à la région de p62 interagissant directement avec Tax.

Ainsi, nous avons montré que Tax et p62 interagissent de manière directe et indépendante de l'ubiquitination de Tax. Cette interaction ne met pas en jeu le domaine PBM de Tax, et est médiée par la région MIR de la protéine p62.

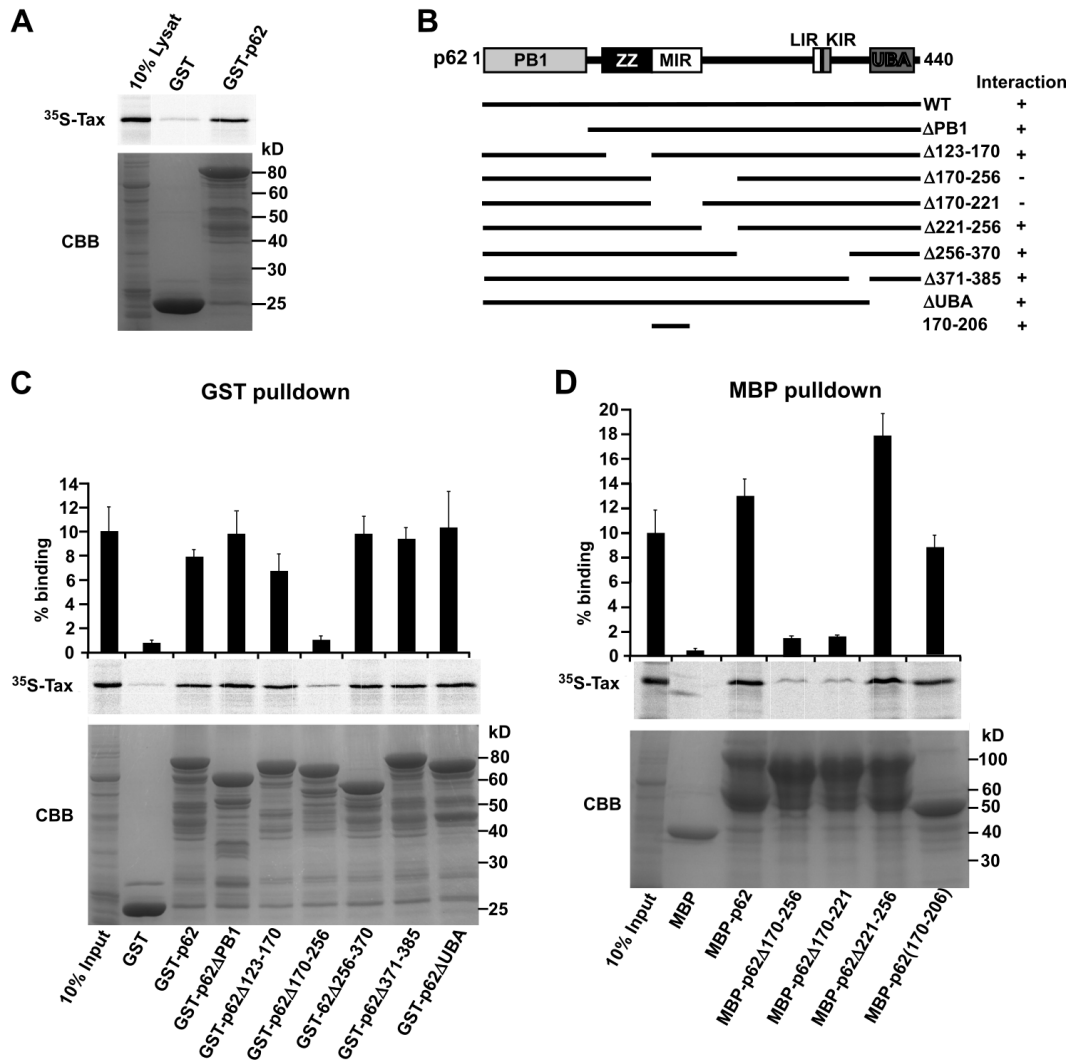


FIGURE 2.3 – P62 interagit avec Tax de manière directe par son domaine MIR *in vitro*

(A) Les constructions GST ou GST-p62 ont été exprimées en bactéries afin d'être utilisées pour des expériences de *GST pulldown* effectuées sur des protéines Tax traduites *in vitro* et marquées radioactivement par du ³⁵S. Les extraits ont ensuite été analysés par autoradiographie après migration en SDS-PAGE (révélé par un marquage au *Coomassie Brilliant Blue*). (B) Représentation schématique des domaines de p62 indiquant les délétions utilisées pour les *GST*- et *MBP-pulldowns* des panels C et D. Les résultats de ces expériences sont indiqués à droite. (C) Des expériences de *GST pulldown* et (D) *MBP pulldown* ont été réalisées en utilisant les différents mutants de délétion de p62 indiqués au panel B. L'interaction a été quantifiée radioactivement sur trois expériences indépendantes, exprimées en pourcentage du niveau de radioactivité de l'extrait pur de ³⁵S-Tax et représentées par leur moyenne ± erreur standard.

C. Localisation sub-cellulaire des complexes Tax / p62

L'interaction directe entre les facteurs Tax et p62 étant maintenant clairement établie, nous avons procédé à la caractérisation de ces complexes Tax / p62, notamment dans le but de déterminer leur localisation sub-cellulaire. Tout d'abord, ces complexes ont été visualisés dans diverses lignées cellulaires par microscopie confocale (Figure 2.4). Des marquages d'immuno-fluorescence ont été réalisés dans des cellules de la lignée HeLa exprimant Tax-His. Le co-marquage spécifique de p62 endogène et de Tax-His montre que ces deux facteurs co-localisent au niveau de nombreux complexes cytoplasmiques, localisés à proximité du noyau (Figure 2.4A). De manière notable, l'expression de Tax semble avoir un effet sur le profil de localisation de p62, avec des granules plus gros et plus concentrés en présence de Tax.

La protéine Tax chroniquement exprimée par les cellules de la lignée C8166 forme également des complexes cytoplasmiques avec p62 endogène, comme indiqué par les marquages immuno-fluorescents réalisés dans cette lignée (Figure 2.4).

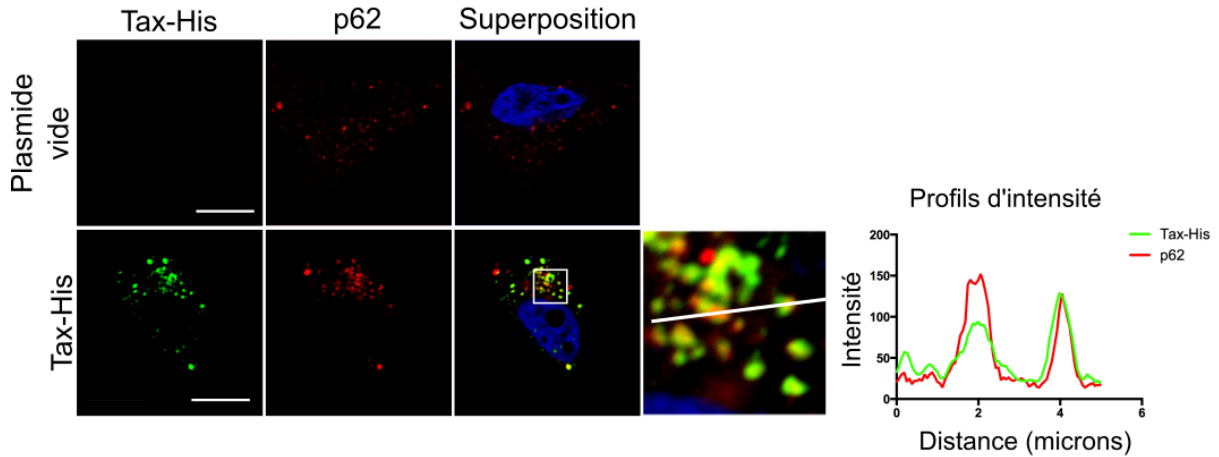
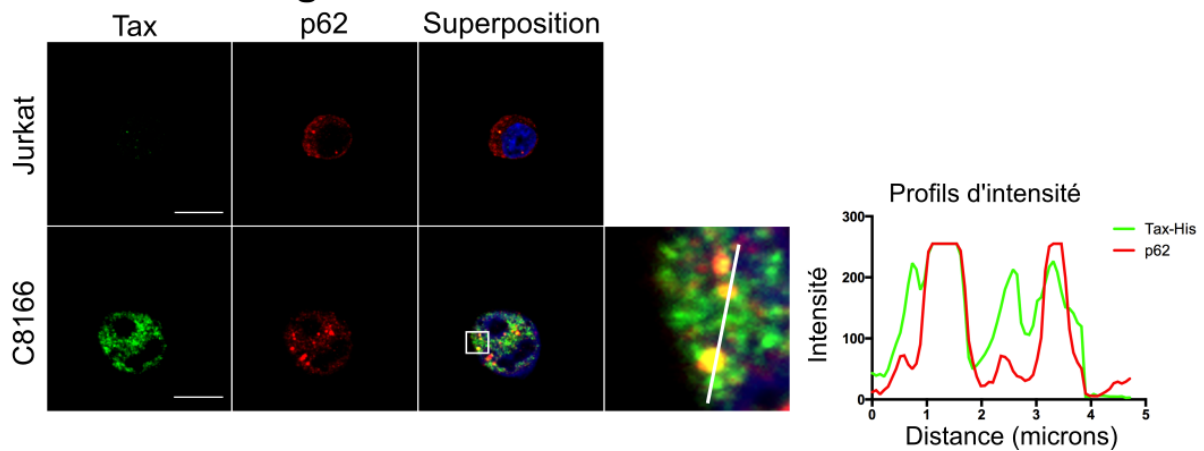
A - Cellules de lignée HeLa**B - Cellules de lignée T**

FIGURE 2.4 – Tax et p62 forment des complexes péri-nucléaires

Des cellules HeLa transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His (A), ainsi que des cellules de la lignée Jurkat non infectées (ligne du haut) et des cellules de la lignée C8166 chroniquement infectées par HTLV-1 (B) ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge) et de l'étiquette His (A) ou de la protéine Tax (B)(en vert). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en bleu). Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Barres d'échelle = 10 μm .

a) **Caractère péri-golgien des complexes Tax / p62** Tax est connu pour être localisé dans le région péri-golgienne, ce qui est compatible avec nos précédentes observations montrant que les complexes Tax / p62 ne se distribuent pas uniformément autour du noyau mais sont regroupés dans une zone. Parallèlement, p62 peut être recruté au niveau de membranes autophagiques. Nous avons donc cherché à déterminer si ces complexes Tax / p62 étaient localisés dans la région péri-golgienne ou au niveau de membranes autophagiques, ces deux localisations ne s'excluant pas mutuellement.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

Nous avons dans un premier temps testé l'hypothèse d'une localisation golgienne de ces complexes (Figure 2.5). Les marquages immuno-fluorescents spécifiques de Tax-His, p62 et du marqueur golgien GM130 (protéine de la matrice cis-golgienne) réalisés en cellules HeLa exprimant Tax-His montrent que les complexes Tax / p62 ont une localisation péri-golgienne (Figure 2.5A). En effet, les zones de colocalisation Tax / p62 sont situées dans la zone marquée par GM130, mais sans colocalisation précise avec ce marqueur.

La réalisation de ces mêmes marquages sur des cellules de la lignée Jurkat exprimant Tax-His confirme ces résultats obtenus en cellules HeLa (Figure 2.5B). Ainsi, la localisation des complexes Tax / p62 est compatible avec la localisation cytoplasmique de Tax couramment décrite dans la littérature, mais semble être différente de celle décrite par exemple pour les complexes Tax / OPTN [Journo et al., 2009]. L'hypothèse d'une potentielle localisation de ces complexes au niveau de membranes autophagiques reste valide, et nous avons voulu la tester.

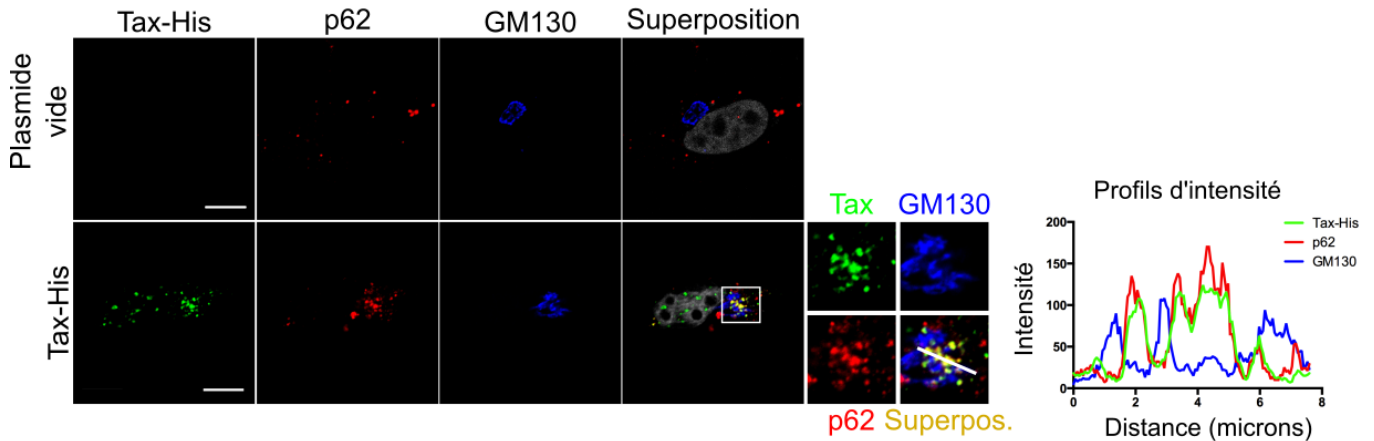
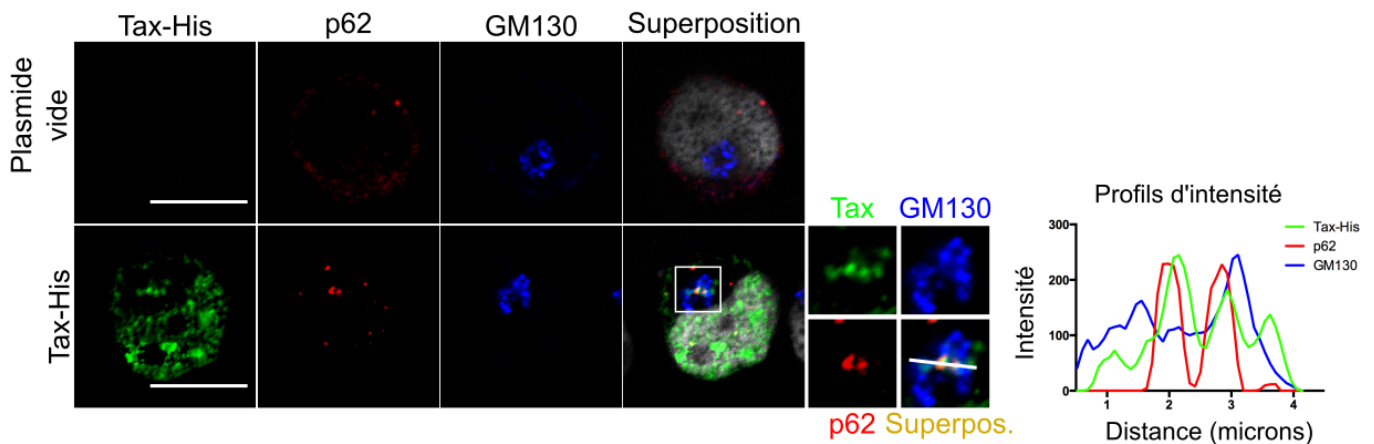
A - Cellules de lignée HeLa**B - Cellules de lignée Jurkat**

FIGURE 2.5 – Les complexes Tax / p62 sont localisés dans une zone péri-golgienne

Des cellules de la lignée HeLa (**A**) ou des cellules de la lignée Jurkat (**B**), transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge), de l'étiquette His (en vert) et du marqueur golgien GM130 (en bleu). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en gris). Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Barres d'échelle = 10 μm .

b) Localisation autophagique des complexes Tax / p62 Afin de tester la possible localisation des complexes Tax / p62 au niveau de membranes autophagiques, nous avons tiré profit du modèle des cellules HeLa GFP-LC3. Ce modèle autophagique classique est basé sur la fusion entre le facteur LC3 et la protéine fluorescente GFP, permettant de visualiser les membranes autophagiques, caractérisées par un recrutement de LC3. Les expériences utilisant ce modèle cellulaire ont été réalisées lors d'une collaboration avec l'équipe de Mathias Faure, localisée au Centre International de Recherche en Infectiologie, qui étudie la machinerie autophagique (Figure 2.6). Les expériences de marquages immuno-fluorescents des facteurs p62

et Tax-His de cellules HeLa GFP-LC3 exprimant Tax-His montrent que les complexes Tax / p62 co-localisent avec le signal GFP-LC3. Ces résultats sont fortement reproductibles, et les complexes Tax / p62 ne co-localisant pas avec LC3 sont largement minoritaires. Cela suggère fortement que les complexes Tax / p62 sont localisés au niveau de membranes autophagiques positives pour LC3.

Cellules de lignée HeLa GFP-LC3

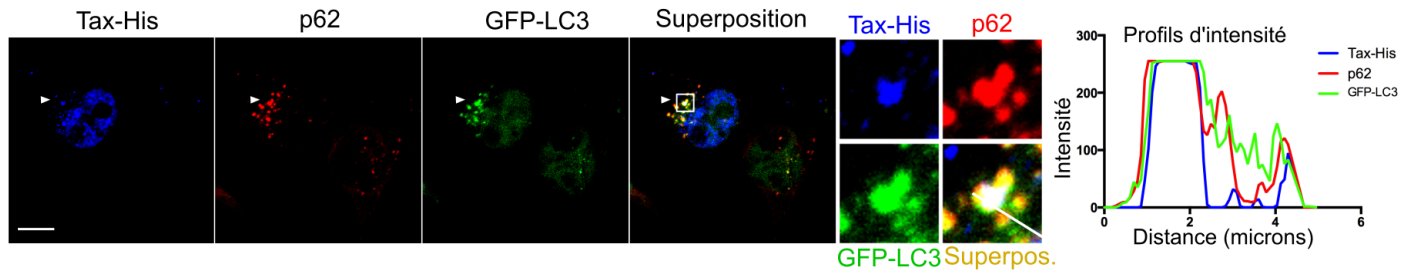


FIGURE 2.6 – Les complexes Tax / p62 sont localisés au niveau de structures autophagiques riches en LC3

Des cellules de la lignée HeLa GFP-LC3 transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge) et de l'étiquette His (en bleu). Le signal vert correspond aux protéines GFP-LC3. Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Barre d'échelle = 10 μm .

c) **Caractère non-dégradatif des structures autophagiques recrutant les complexes Tax / p62** La caractérisation de la nature exacte de ces membranes positives pour LC3 nécessiterait de plus amples investigations, notamment en ayant recours à des expériences de microscopie électronique permettant d'identifier les membranes autophagiques. Dans l'optique de l'étude fonctionnelle de cette interaction, nous avons privilégié une question, celle de déterminer si ces membranes étaient dégradatives ou non (Figure 2.7). Pour ce faire, nous avons tout d'abord inhibé la dégradation autophagique à l'aide d'un traitement par un cocktail d'inhibiteurs lysosomaux (E64d et pepstatine). Ce traitement résulte en une stabilisation du niveau de p62, montrant que l'inhibition de la dégradation autophagique fonctionne. Cette inhibition ne change pas le niveau de Tax-His, suggérant que dans ces conditions, Tax ne subit pas de dégradation autophagique significative (Figure 2.7A).

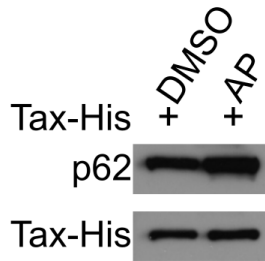
En complément, des marquages immuno-fluorescents spécifiques de p62, Tax-His et du marqueur lysosomal LAMP1 ont été réalisés sur des cellules HeLa transfectées par Tax-His. Ces marquages révèlent l'absence d'une localisation claire des complexes Tax / p62 au niveau des

compartiments lysosomaux, suggérant fortement que les membranes autophagiques où sont localisés ces complexes ne sont pas dégradatives (Figure 2.7B).

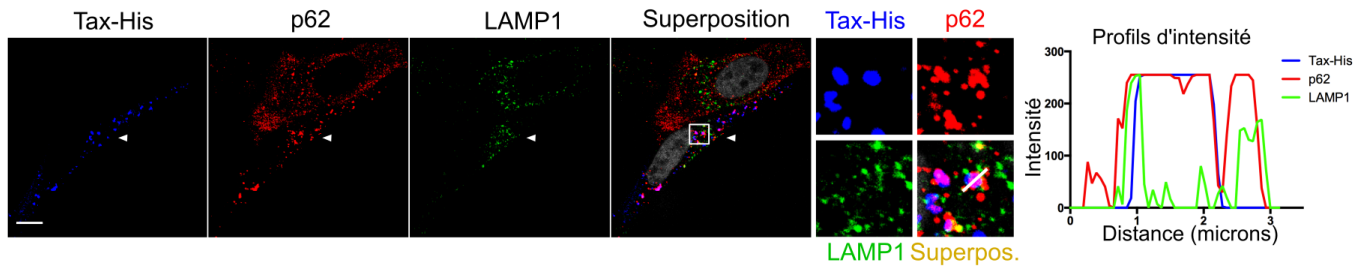
Enfin, le niveau protéique de Tax a été comparé dans diverses lignées cellulaires entre des conditions d'expression ou non de p62, en utilisant des lignées murines KO pour p62 (MEF p62^{-/-}) ainsi que des cellules 293T traitées ou non par des siARN spécifiques de p62 (sip62). Le résultat de ces expériences montre que l'absence d'expression de p62 n'a pas d'impact sur le niveau de Tax détectable en immunoblot, et ce de manière reproductible pour différentes doses d'expression de Tax (Figure 2.7C).

Toutes ces données montrent que Tax et p62 interagissent au niveau de membranes autophagiques non-dégradatives. Ce caractère non-dégradatif permet d'envisager l'existence d'étapes de signalisation médiée par Tax au niveau de ces structures, et qu'un effet autre que la simple dégradation autophagique de Tax peut être envisagé. Nous allons maintenant nous pencher sur l'étude de potentielles conséquences de cette interaction sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax.

A - Cellules de lignée HeLa



B - Cellules de lignée HeLa



C - Cellules de lignées MEF et HEK 293T

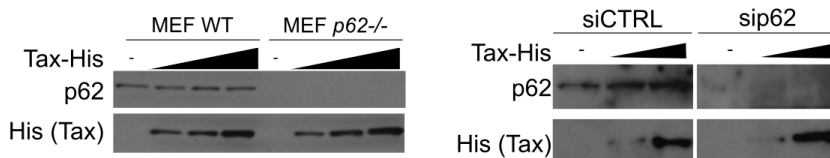


FIGURE 2.7 – Les structures autophagiques auxquelles sont situés les complexes Tax / p62 semblent non-dégradatives

(A) Des cellules HeLa transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ont été traitées pendant 22 h, soit avec du DMSO (condition DMSO), soit avec un cocktail des inhibiteurs lysosomaux E64d et pepstatine (condition AP) avant d'être lysées puis analysées par immunoblot spécifique de p62 et de l'étiquette His. (B) Des cellules HeLa transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge), de l'étiquette His (en bleu) et du marqueur lysosomal LAMP1 (en vert). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en gris). Barre d'échelle = 10 μ m. (C) Des cellules de lignées MEF WT, MEF p62^{-/-} ainsi que des cellules de lignée HEK 293T traitées avec des siARN spécifiques de p62 (sip62) ou aspécifiques (siCTRL) ont été transfectées par diverses doses d'un vecteur d'expression de Tax-His, avant d'être analysées par immunoblots spécifiques de p62 et de l'étiquette His.

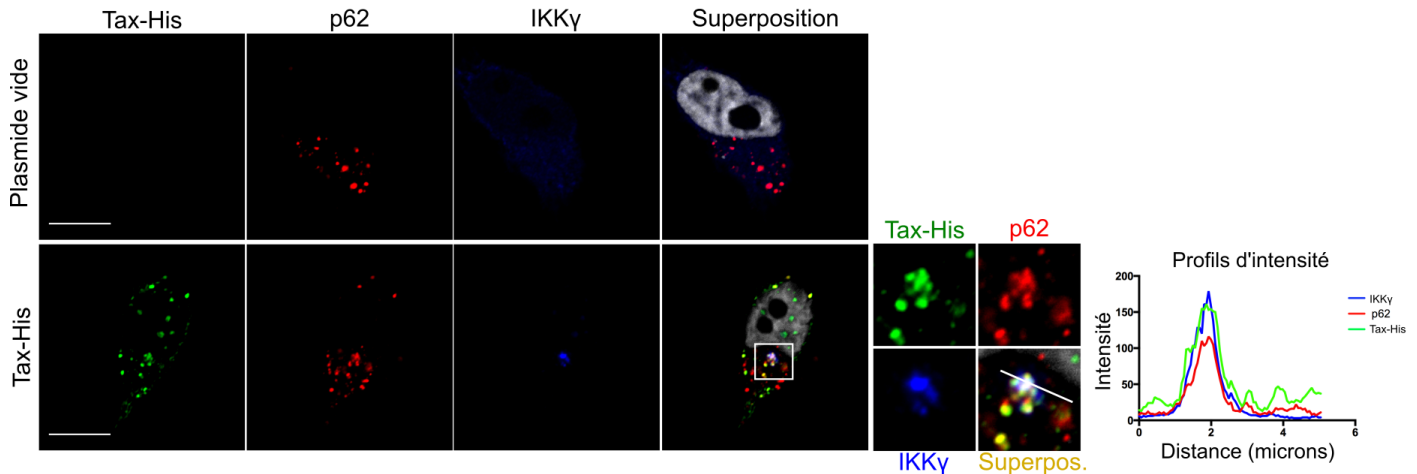
II Étude de la potentialisation par p62 de l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax

A. Les complexes Tax / p62 et le facteur IKK γ

a) **Localisation de IKK γ aux complexes Tax / p62** Après nous être penchés sur la localisation sub-cellulaire des complexes Tax / p62, nous avons voulu aller plus loin dans leur caractérisation. Notamment, nous avons voulu tester l'hypothèse d'une potentielle conséquence fonctionnelle de l'interaction entre Tax et p62 sur l'activation de la voie NF- κ B. L'une des premières étapes de l'activation de NF- κ B par Tax est le recrutement du facteur IKK γ . Nous avons donc cherché à déterminer les relations entre ce facteur et les complexes Tax / p62 (Figure 2.8).

Lors de l'expression de Tax par des cellules des lignées HeLa ou Jurkat, il est possible d'observer un recrutement massif du facteur IKK γ au niveau de structures positives pour Tax (Figure 2.8). Ces structures sont appelées signalosomes Tax / IKK γ . La réalisation de marquages d'immuno-fluorescence spécifiques des protéines p62 et IKK γ endogènes, ainsi que de Tax-His dans ces différentes lignées a permis d'observer qu'une partie des complexes Tax / p62 décrits précédemment co-localisent également avec le IKK γ . Ainsi, ces données suggèrent l'existence de complexes ternaires contenant à la fois Tax, p62 et IKK γ .

A - Cellules de lignée HeLa



B - Cellules de lignée Jurkat

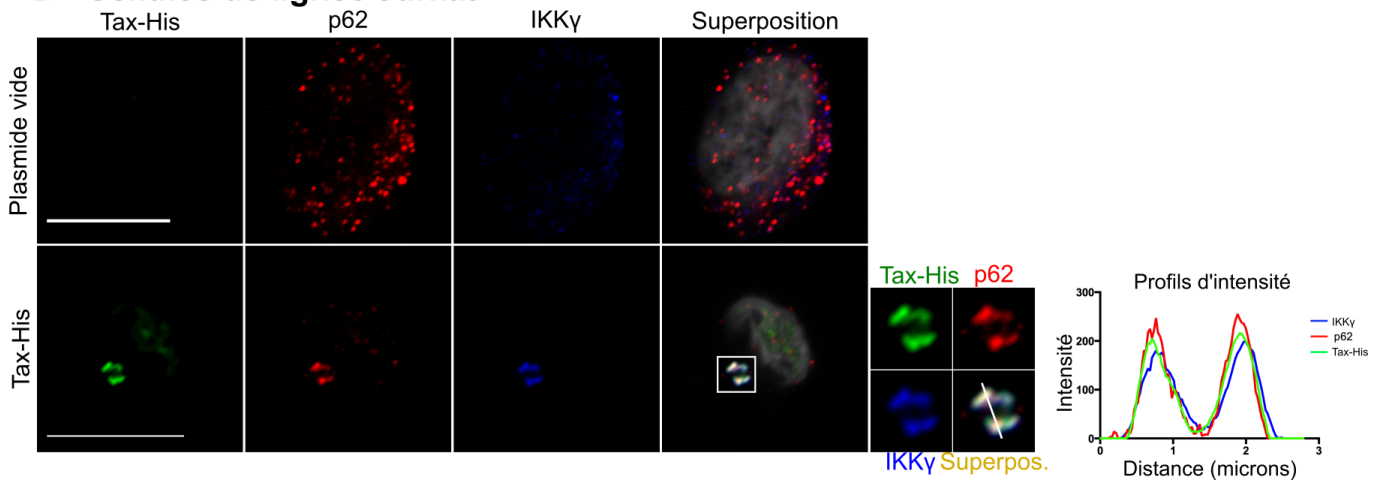


FIGURE 2.8 – Le facteur $IKK\gamma$ colocalise avec les complexes Tax / p62

(A) Des cellules HeLa transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge), de l'étiquette His (en vert) et de $IKK\gamma$ (en bleu). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en gris). Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Barres d'échelle = 10 μm . (B) Des cellules de la lignée Jurkat transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immuno-fluorescent spécifique de p62 (en rouge), de l'étiquette His (en vert) et de $IKK\gamma$ (en bleu). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en gris). Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Barres d'échelle = 10 μm .

b) **Existence de complexes ternaires Tax / p62 / $IKK\gamma$** La description d'une colocalisation du signalosome Tax / $IKK\gamma$ avec p62 suggère l'existence de potentiels complexes ternaires contenant à la fois Tax, p62 et $IKK\gamma$. Cette hypothèse est renforcée par la littérature, p62 ayant été décrit comme un partenaire possible du facteur $IKK\gamma$ en condition d'activation

de la voie NF- κ B [Zotti et al., 2014]. La détermination de la possibilité de cette interaction a été effectuée par un protocole de double purification ayant pour but d'isoler le signalosome Tax / IKK γ (Figure 2.9A). Pour ce faire, des cellules HeLa ont été transfectées ou non par des vecteurs d'expression des constructions Tax-His et IKK γ -FLAG. Les complexes Tax / IKK γ ont tout d'abord été purifiés en effectuant une immuno-précipitation de IKK γ -FLAG à l'aide d'une matrice d'affinité de FLAG. Après élution de cette matrice, un protocole de purification de Tax-His a ensuite été réalisé à l'aide d'une matrice de Ni-NTA, fixant spécifiquement l'étiquette His.

À la suite de ces purifications, les complexes contenant à la fois Tax et IKK γ sont isolés. Des analyses par immunoblots spécifiques des étiquettes His, FLAG et de la protéine p62 ont alors montré la présence de p62 au niveau de ces complexes, prouvant l'existence de complexes Tax / p62 / IKK γ . À la suite des expériences précédentes, ce résultat démontre que Tax, p62 et IKK γ forment des complexes cellulaires, très probablement localisés au niveau des membranes autophagiques décrites précédemment. Ce résultat suggère également la possibilité d'une implication de p62 dans la formation des complexes Tax / IKK γ , que nous avons voulu tester.

La question de l'implication de p62 dans la formation du signalosome Tax / IKK γ a été étudiée en réalisant des expériences d'immuno-précipitations dans des cellules des lignées MEF sauvage et MEF p62^{-/-} transfectées ou non par des vecteurs d'expression de Tax-His et IKK γ -FLAG (Figure 2.9B). Après précipitation spécifique de IKK γ -FLAG, le facteur Tax-His est détecté à la fois dans les extraits de cellules MEF sauvages et de MEF p62^{-/-}. Ainsi, la présence de p62 n'est pas nécessaire pour la formation du signalosome Tax / IKK γ .

Ces données montrent que Tax forme des complexes avec p62 et IKK γ , suggérant un possible recrutement du signalosome Tax / IKK γ par p62 au niveau de membranes autophagiques. Cette interaction avec ce facteur régulateur de la voie NF- κ B nous a amenés à tester plus précisément l'hypothèse d'un effet de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax.

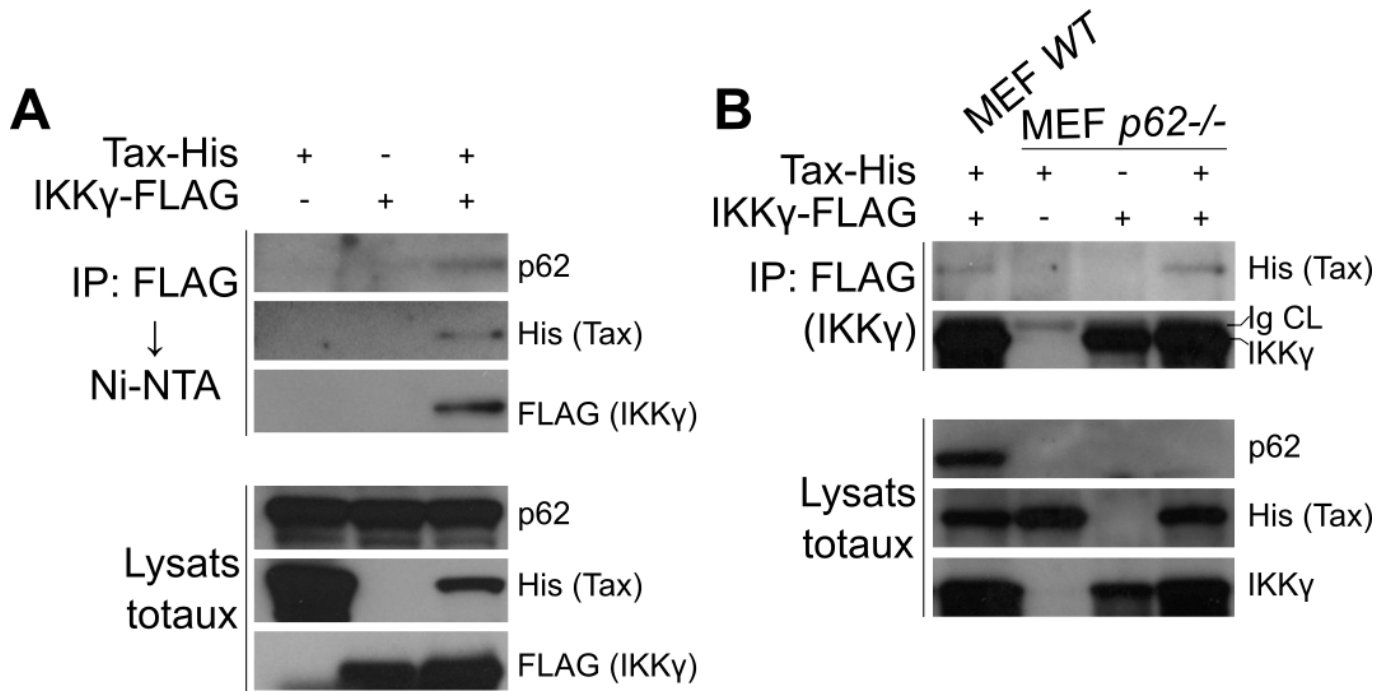


FIGURE 2.9 – Le facteur IKK γ est associé aux complexes Tax / p62

(A) Des cellules HeLa ont été transfectées ou non par des vecteurs d'expression de Tax-His et IKK γ -FLAG, avant de subir une lyse puis un double protocole de purification, tout d'abord par une matrice d'affinité spécifique de FLAG, puis par une matrice de nickel permettant la purification de l'étiquette His. Après ce protocole de purification des complexes Tax / IKK γ , des analyses par immunoblots ont été effectuées en ciblant spécifiquement p62 ainsi que les étiquettes His et FLAG. (B) Des cellules MEF sauvages (WT) ou KO pour p62 (p62^{-/-}) ont été transfectées ou non par des vecteurs d'expression de Tax-His et IKK γ -FLAG, avant de subir une lyse suivie d'une immuno-précipitation spécifique de l'étiquette FLAG. Les extraits ont ensuite été analysés par immunoblots spécifiques de IKK γ , p62 et de l'étiquette His. *Ig CL* : chaînes lourdes d'immunoglobulines.

B. Effet de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax

a) **P62, potentiateur spécifique de l'activation de NF- κ B par Tax** Après avoir caractérisé l'existence de complexes contenant à la fois Tax, p62 et IKK γ , nous avons voulu déterminer l'impact fonctionnel de p62 sur l'activité de Tax. Pour ce faire, diverses expériences utilisant des gènes rapporteurs luciférase ont été réalisées pour évaluer les effets d'une absence d'expression de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B ainsi que sur l'expression du LTR proviral de HTLV-1 (Figure 2.10). L'étude de l'expression du LTR nous permet ici de déterminer si les éventuels effets observés sont spécifiques de l'activité de Tax sur NF- κ B, ou s'ils s'appliquent également à des fonctions nucléaires de Tax.

La mesure de l'activité luciférase NF- κ B à partir d'extraits de cellules MEF sauvages et de MEF KO pour p62 exprimant diverses doses de Tax montre que l'activation médiée par

II. POTENTIALISATION PAR P62 DE L'ACTION DE TAX SUR NF- κ B

Tax de la voie NF- κ B est significativement plus faible dans les cellules n'exprimant pas p62 (Figure 2.10A). Ainsi, p62 semble porter un effet potentiateur sur l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B. Cet effet est spécifique de l'activation de NF- κ B par Tax, car la mesure de l'activité luciférase du LTR de HTLV-1 dans les mêmes conditions ne montre pas de différence significative entre les cellules exprimant ou non p62 (Figure 2.10B).

Afin de confirmer ces résultats en cellules humaines, des mesures de luciférase NF- κ B ont été effectuées sur des extraits de cellules 293T traitées par des siARN spécifiques de p62 (sip62) ou aspécifiques (siCTRL), exprimant diverses doses de Tax (Figure 2.10C). Ces expériences confirment que l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B est significativement plus faible dans les cellules n'exprimant pas p62. Cet effet semble également spécifique de NF- κ B, la transfection des cellules par des sip62 n'ayant pas d'effet significatif sur l'activation du LTR de HTLV-1 par Tax (Figure 2.10D). L'ensemble de ces résultats démontre que p62 porte un effet potentiateur de l'activation de NF- κ B par Tax, pour des niveaux endogènes d'expression de p62.

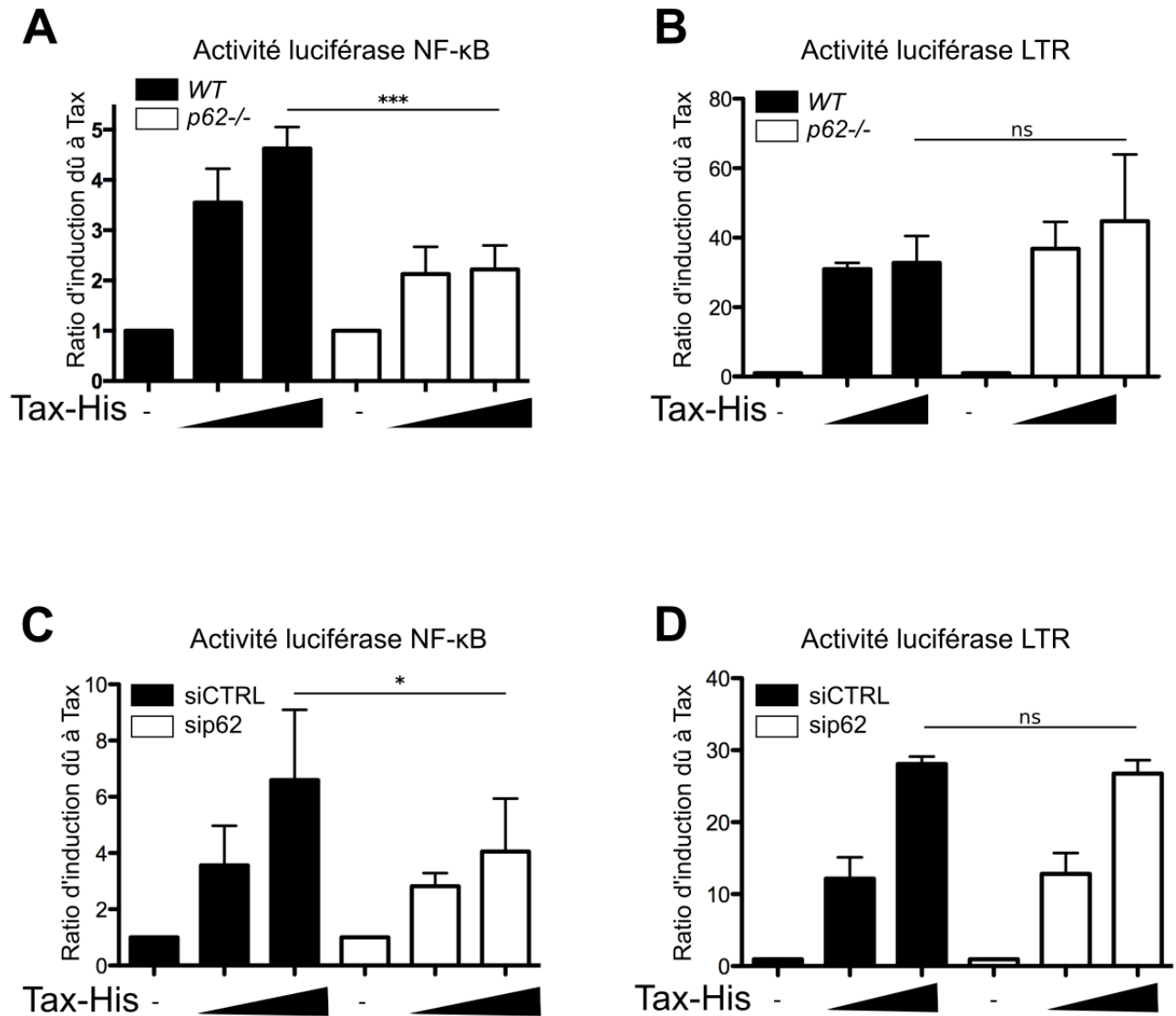


FIGURE 2.10 – P62 porte un effet potentiateur sur l'activation de la voie NF-κB médiée par Tax

(A - B) Des cellules MEF sauvages (WT) et KO pour p62 (p62^{-/-}) ont été transfectées ou non par différentes doses d'un vecteur d'expression de Tax-His, ainsi que par un gène rapporteur luciférase placé en amont de séquences promotrices NF-κB (A) ou LTR (B). Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport aux conditions sans Tax correspondantes. (C - D) Des cellules HEK 293T ont été transfectées par des siARN spécifiques de p62 (sip62) ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d'être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par différentes doses d'un vecteur d'expression de Tax-His et un gène rapporteur luciférase NF-κB (C) ou LTR (D). Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport aux conditions sans Tax correspondantes. Les données sont représentées par la moyenne ± erreur standard et ont été analysées par ANOVA monofactorielle, suivie par des test *post-hoc* selon la formule de Bonferroni pour comparer les moyennes entre elles (**, p<0,01 ; *, p<0,05 ; ns, p>0.05).

b) Caractérisation de l'effet de p62 sur l'ubiquitination de Tax Dans le cas de la potentialisation de l'activation de la voie NF- κ B par OPTN, il a été démontré que ce dernier stabilise l'ubiquitination de Tax. Nous avons donc cherché à savoir si p62 a un effet similaire sur l'ubiquitination de Tax. Pour ce faire, nous avons déterminé l'ubiquitination de Tax par immunoblot après purification de la protéine Tax-His sur matrice de Ni-NTA effectuée sur des extraits cellulaires ayant subi une lyse en conditions hautement dénaturantes à l'aide d'un tampon guanidium, ce afin de limiter les phénomènes de dé-ubiquitination et de purifier uniquement les éléments liés à Tax de façon covalente. Ces lysats sont obtenus à partir de cellules exprimant des constructions Tax ou Tax-His (la construction Tax tenant lieu de contrôle de purification Ni-NTA) et préalablement traités ou non par des siARN spécifiques de p62 (Figure 2.11).

Ces expériences montrent que le niveau global d'ubiquitination de Tax ne varie pas de manière significative entre les conditions exprimant ou non la protéine p62. Il semble donc que p62 n'a pas d'effet sur le niveau global d'ubiquitination de Tax.

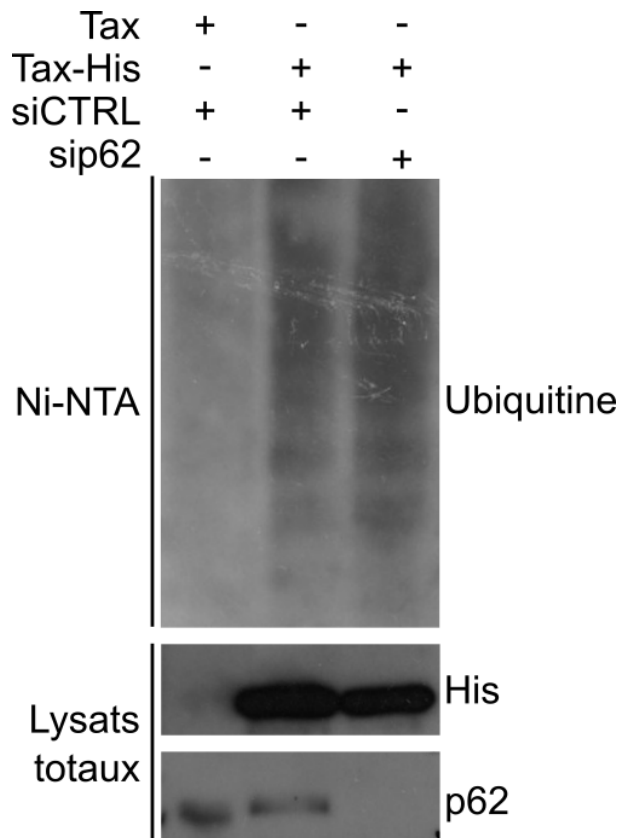


FIGURE 2.11 – P62 n'a pas d'effet sur le niveau d'ubiquitination de Tax

Des cellules HeLa ont été transfectées par une construction de Tax fusionnée ou non à l'étiquette His, ainsi que par des siARN aspécifiques (siCTRL) ou spécifiques de la protéine p62 (sip62). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon fortement dénaturant contenant du guanidium, avant de subir une purification d'affinité sur matrice Ni-NTA permettant de purifier les protéines Tax-His. Ces extraits purifiés ont ensuite été analysés par immunoblots spécifiques de l'ubiquitine. Les lysats totaux ont quant à eux été analysés par immunoblots spécifiques de la protéine p62 et de l'étiquette His.

c) Importance de l'autophagie pour l'activation de NF- κ B par Tax, et pour l'effet potentiateur de p62 Nous avons donc montré que p62 a un effet potentiateur sur l'activation de NF- κ B par Tax. Cet effet peut être mis en rapport avec la description que nous avons faite plus haut de complexes contenant à la fois Tax, p62 et IKK γ , ces complexes étant potentiellement localisés au niveau de membranes autophagiques LC3-positives, à l'image des complexes Tax / p62. Ces éléments nous ont amenés à finalement déterminer l'éventuelle implication de la voie autophagique dans l'activation de NF- κ B par Tax en général, ainsi que dans la potentialisation par p62 de l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax en particulier.

Dans cette optique, nous avons réalisé des mesures d'activité luciférase NF- κ B dans des cellules 293T exprimant Tax et préalablement traitées par des siARN spécifiques de facteurs cru-

II. POTENTIALISATION PAR P62 DE L'ACTION DE TAX SUR NF- κ B

ciaux des phases précoces d'activation de l'autophagie sélective (siATG7, siATG5 et siBECN1) ou des siARN aspécifiques (siCTRL) (Figure 2.12A). Ces mesures montrent que l'activation de la voie NF- κ B par Tax est significativement plus faible dans les cellules n'exprimant pas l'un de ces facteurs autophagiques. Ainsi, l'autophagie semble impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Ces résultats sont concordants avec des données parues au cours du travail de thèse, montrant une inhibition de l'activation de la voie NF- κ B par Tax par la répression génétique des facteurs ATG5 et BECN1 [Chen et al., 2015].

Concernant plus spécifiquement l'effet potentiateur de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax, des expériences de luciférase NF- κ B ont été réalisées sur des extraits cellulaires de cellules 293T traitées avec des siARN spécifiques du facteur ATG7, et transfectées avec un vecteur d'expression de Tax-His, ainsi qu'avec un vecteur d'expression de la construction Myc-p62 (Figure 2.12B). Ce montage expérimental permet, en sur-exprimant légèrement la protéine p62, de visualiser directement l'effet potentiateur de p62 sur l'activation de NF- κ B médiée par Tax en présence du facteur ATG7. Cette potentialisation est complètement abolie dans les cellules n'exprimant pas ATG7. Dans ces conditions, p62 semble même avoir un léger effet inhibiteur sur l'activation de NF- κ B.

Ces dernières données montrent l'importance de l'autophagie dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax. À la fois l'effet activateur global de cette voie par Tax, ainsi que la potentialisation de cet effet spécifiquement attribuable à p62 requièrent la présence d'une machinerie autophagique pleinement fonctionnelle, notamment la formation de membranes autophagiques sur lesquelles peuvent être recrutés les complexes Tax / p62 / IKK γ décrits précédemment.

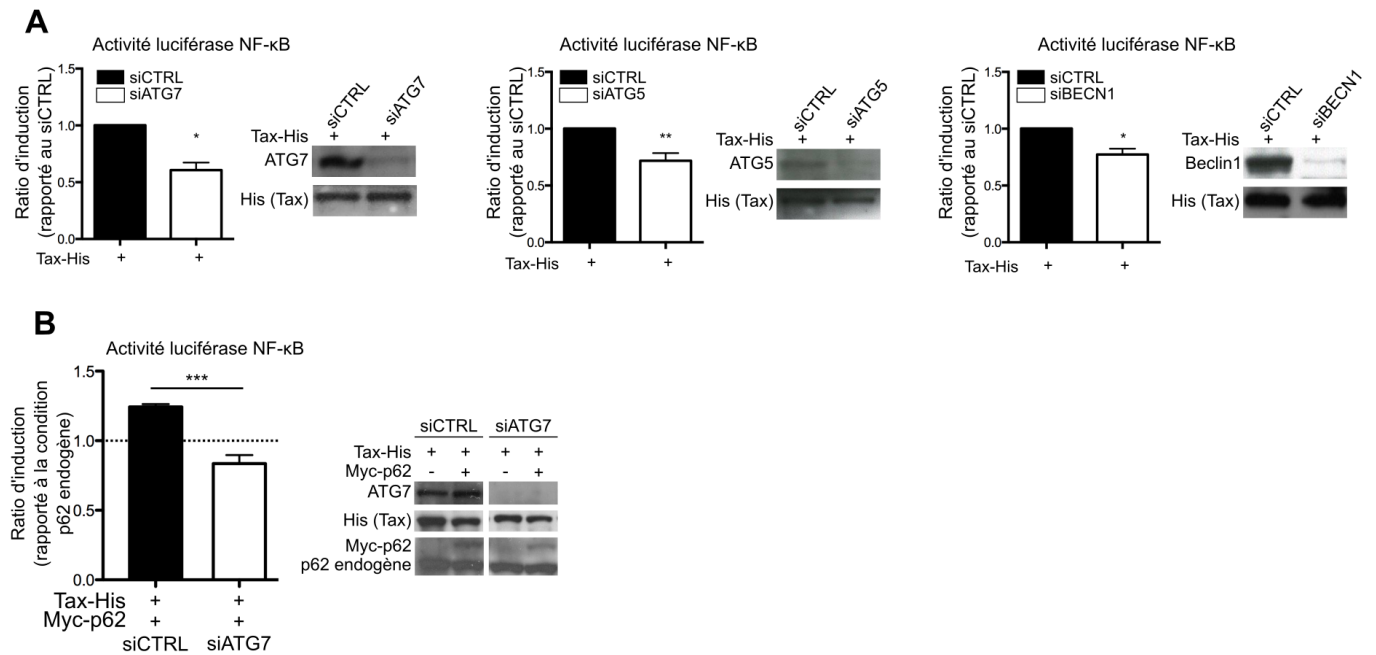


FIGURE 2.12 – L'autophagie est impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax

(A) Des cellules HEK 293T ont été transfectées par des siARN spécifiques des gènes *ATG7*, *ATG5*, *BECN1* (siATG7, siATG5, siBECN1) ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d'être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par un vecteur d'expression de Tax-His et un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport aux conditions siCTRL correspondantes. Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard et ont été analysées par test de Student uni-directionnel pour comparer les moyennes (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$). Les lysats cellulaires ont également été analysés par immunoblot spécifique des facteurs ATG7, ATG5, BECN1 et de l'étiquette His. (B) Des cellules HEK 293T ont été transfectées par des siARN spécifiques du gène *ATG7* ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d'être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par un vecteur d'expression Myc-p62, un vecteur d'expression Tax-His et un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport à la condition p62 endogène correspondante. Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard et ont été analysées par ANOVA monofactorielle, suivie par des test *post-hoc* selon la formule de Bonferroni pour comparer les moyennes entre elles (**, $p < 0,01$). Les lysats cellulaires ont également été analysés par immunoblot spécifique des facteurs ATG7, p62 et de l'étiquette His.

C. Bilan : Importance de l'autophagie sélective dans la potentialisation, par p62, de l'activation de NF- κ B par Tax

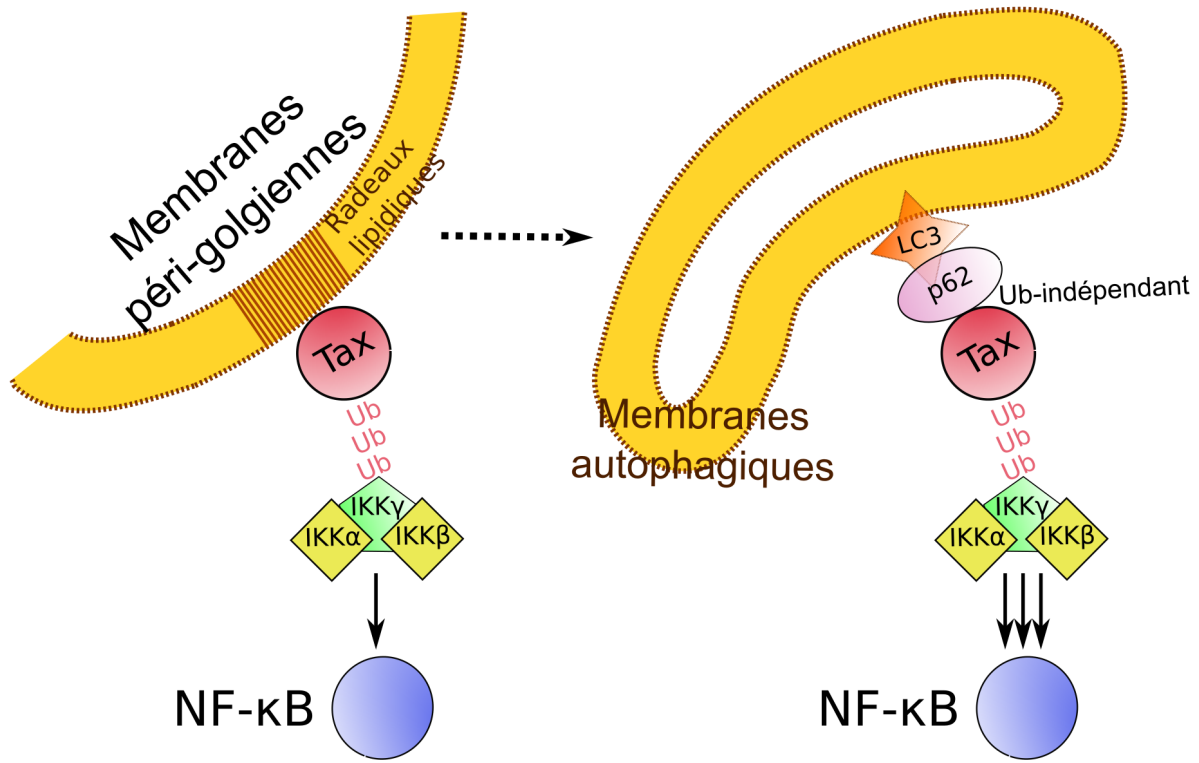


FIGURE 2.13 – Modèle proposé pour la potentialisation par p62 de l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B

À l'issue de ces expériences, nous pouvons établir un premier bilan des interactions fonctionnelles entre Tax et p62 (Figure 2.13). Nos travaux précédemment exposés montrent que Tax et p62 interagissent de manière directe, sans faire intervenir l'ubiquitination de Tax, par le biais du domaine MIR de la protéine p62. Tax et p62 forment des complexes localisés au niveau de membranes autophagiques positives pour le facteur LC3, au sein desquels on trouve également le facteur IKK γ . À un niveau d'expression endogène, p62 porte un effet de potentialisation de l'activation de NF- κ B médiée par Tax, qui est dépendant de la fonctionnalité des voies autophagiques. Nous avons également montré que l'autophagie portait un effet positif général sur l'activation de NF- κ B médiée par Tax, ce qui est concordant avec la littérature.

Le caractère facultatif de p62 pour la formation des signalosomes Tax / IKK γ suggère fortement que ces signalosomes sont formés en absence de p62 avant d'être recrutés au niveau des

membranes autophagiques où elles interagissent avec p62. Les modalités de ce recrutement sont pour l'heure inconnues, et seront abordées lors de la discussion.

Afin de confirmer cet effet potentiateur porté par p62 lorsqu'il est exprimé à de faibles doses, nous avons voulu étudier l'impact d'une sur-expression de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Nous allons maintenant nous pencher sur l'étude des effets de la sur-expression de p62.

III Étude de la déplétion autophagique de la protéine Tax en conditions de sur-expression de p62

A. Conséquences de la sur-expression de p62 sur Tax

Ayant constaté l'effet potentiateur de p62 pour des doses d'expression endogènes ou en faible sur-expression, notre hypothèse était que cette potentialisation était continue et proportionnelle à la dose d'expression de p62, comme cela a été décrit pour OPTN. Nous avons ainsi étudié l'effet d'une forte sur-expression de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax.

Dans un premier temps, l'activation de la voie NF- κ B ainsi que du LTR de HTLV-1 ont été étudiées en utilisant les mêmes rapporteurs luciférases que précédemment, mais en exprimant des doses croissantes de la protéine p62 (Figure 2.14). De manière surprenante, l'activation de la voie NF- κ B par Tax est inhibée par l'expression de fortes doses de p62 (Figure 2.14A). Cet effet semble spécifique de NF- κ B, comme suggéré par le fait que l'activation du LTR n'est pas significativement affectée, bien qu'une baisse progressive soit observée (Figure 2.14B). L'analyse des extraits cellulaires par immunoblot montre que la détection de la protéine Tax diminue d'une manière qui est inversement proportionnelle à la sur-expression de p62 (Figure 2.14C).

Ces données montrent qu'une sur-expression de p62 provoque une inhibition de l'activation de NF- κ B médiée par Tax, *a priori* causée par une déplétion de Tax.

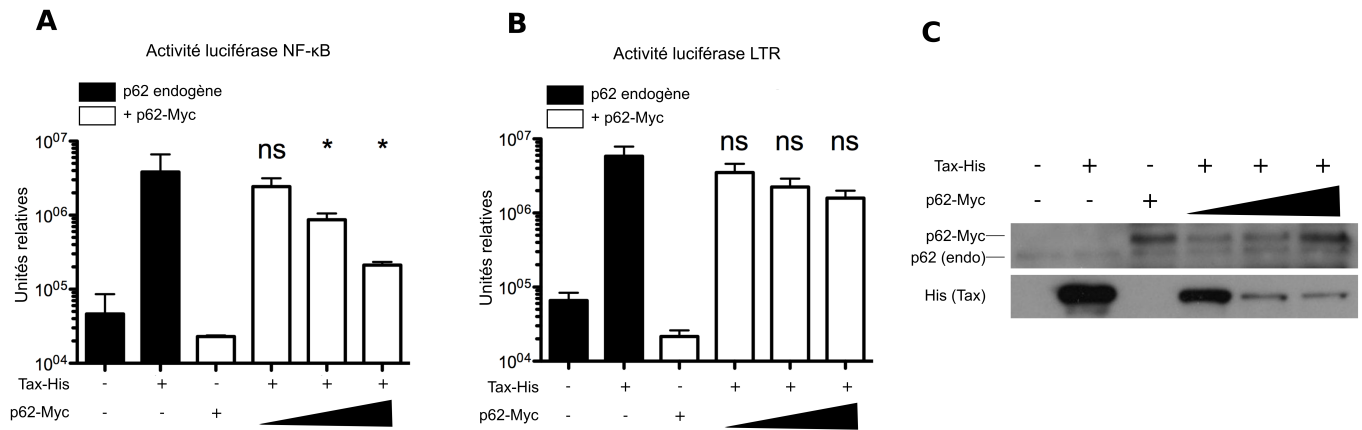


FIGURE 2.14 – La sur-expression de p62 porte un effet inhibiteur sur l’activation de NF-κB par Tax

(A - C) Des cellules 293T ont été transfectées ou non par un vecteur d’expression de Tax-His, ainsi que par différentes doses d’un vecteur d’expression de p62-Myc et d’une construction rapportrice luciférase NF-κB (A) ou LTR (B). Après 24 h, l’activité luciférase a été mesurée et est exprimée en unités relatives. Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard et ont été analysées par ANOVA monofactorielle, suivie par des test *post-hoc* selon la formule de Bonferroni pour comparer les moyennes entre elles (*, $p < 0,05$; ns, $p > 0,05$). (C) Les lysats cellulaires ont également été analysés par immunoblot spécifique de p62 et de l’étiquette His.

B. Caractérisation de la déplétion de Tax en sur-expression de p62

a) **Tax n’est pas intégralement dégradé en sur-expression de p62** L’étape suivante était la caractérisation de cette déplétion de Tax observée lors de la sur-expression de p62. L’hypothèse principale, tenant compte de la fonction autophagique de p62 et de données dans la littérature suggérant que Tax est une cible de l’autophagie, était que Tax soit massivement recruté par p62 au niveau de membranes autophagiques, et orienté ensuite vers des voies de dégradation autophagiques [Tang et al., 2013].

Le recrutement possible de Tax par p62 a tout d’abord été étudié à l’aide d’expériences d’immuno-marquages fluorescents en sur-expression de p62. Les cellules HeLa exprimant une forte dose de p62 ectopique présentent un phénotype particulier, présentant d’importants amas péri-nucléaires de p62 (Figure 2.15). Dans ces cellules qui expriment également Tax, la localisation sub-cellulaire de ce dernier est très différente de sa localisation normale observable par exemple dans les expériences citées lors de la partie précédente (Figure 2.4). En effet, Tax colocalise fortement avec ces amas de p62. Cette véritable relocalisation de Tax par la simple sur-expression de p62 suggère fortement le recrutement de Tax par p62 dans ces conditions.

Ces résultats d’immuno-fluorescence nous ont amenés à formuler l’hypothèse selon laquelle

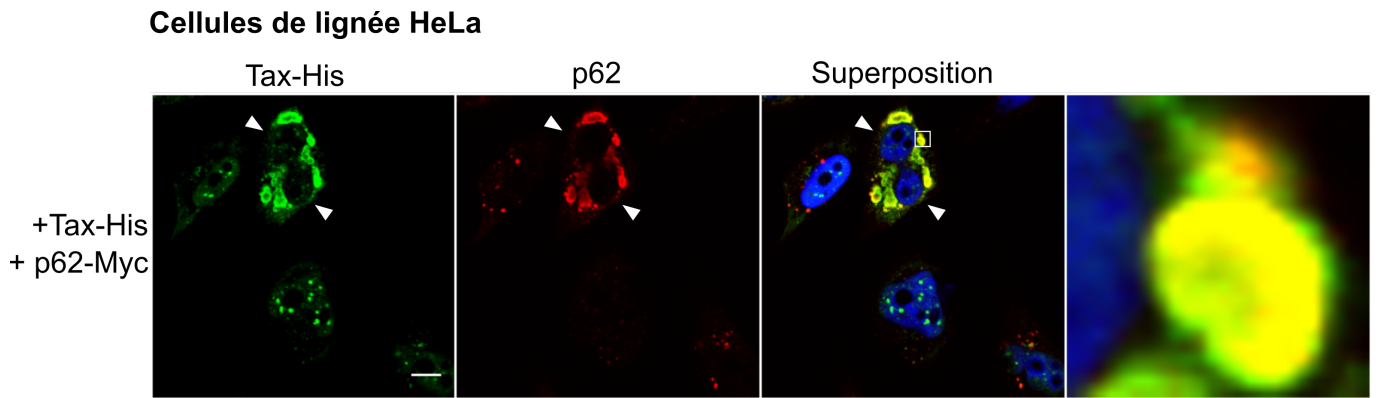


FIGURE 2.15 – **Tax est recruté par p62 en sur-expression de p62**

Des cellules de la lignée HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expression de Tax-His et p62-Myc avant d'être fixées et perméabilisées puis de subir un immunomarquage fluorescent spécifique des étiquettes His (en vert) et de p62 (en rouge). Un marquage nucléaire a également été réalisé avec du DAPI (en bleu). Les flèches indiquent les cellules sur-exprimant p62-Myc. Barre d'échelle = 10 μm .

l'effet observé n'est pas dû à une dégradation de Tax, mais plutôt à une séquestration de ce dernier au niveau de compartiments insensibles à la lyse par le tampon utilisé. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé une expérience de lyses comparées. Dans cette expérience, deux lyses différentes ont été effectuées sur des cellules provenant des mêmes puits de transfection (Figure 2.16). La première lyse a été effectuée dans le tampon Ripa (composition en annexe), utilisé dans toutes les autres expériences d'immunoblot réalisées jusqu'ici. La seconde lyse a été effectuée en utilisant directement le tampon Laemmli (composition en annexe) servant de tampon de dépôt pour les électrophorèses protéiques. Cette seconde lyse, plus stringente que la lyse utilisant le Ripa, permet de déterminer si la diminution du signal Tax observée en sur-expression de p62 est liée à un manque de solubilisation de Tax par le tampon Ripa.

Les résultats de cette expérience montrent qu'en condition de sur-expression de p62, la diminution de la détection de Tax est observée uniquement après une lyse en Ripa, mais que le niveau de Tax n'évolue pas lorsque la lyse est effectuée dans le tampon Laemmli, dont le pouvoir de solubilisation est plus fort (Figure 2.16).

III. DÉPLÉTION DE TAX EN SUR-EXPRESSION DE P62

Cela signifie donc qu'en sur-expression de p62, Tax ne semble pas être significativement dégradé, mais son accessibilité à la lyse par le tampon Ripa diminue à mesure que la dose d'expression de p62 par la cellule augmente. Cette conclusion soulève l'hypothèse d'un possible recrutement de Tax au niveau de compartiments vésiculaires, qui pourraient séquestrer Tax, le coupant ainsi des médiateurs cytoplasmiques de la voie NF- κ B.

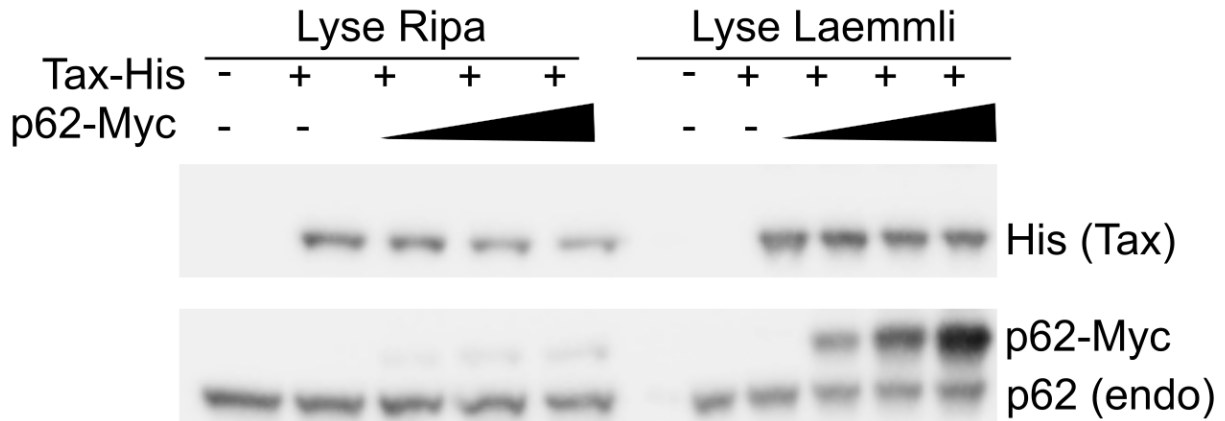


FIGURE 2.16 – Tax est déplété en condition de sur-expression de p62

Des cellules de la lignée HeLa ont été transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His, ainsi que par différentes doses d'un vecteur d'expression de p62-Myc, comme indiqué. Les cellules ont ensuite été lysées selon deux protocoles différents : soit à l'aide du tampon de lyse Ripa, soit en utilisant du tampon Laemmli. Les lysats ont ensuite été analysés par immunoblots spécifiques de la protéine p62 et de l'étiquette His. Les puits des conditions Ripa contiennent l'équivalent d'environ deux fois plus de cellules que les puits des conditions Laemmli.

b) Tax est déplété spécifiquement du cytosol en sur-expression de p62 Afin de tester l'hypothèse d'une potentielle séquestration vésiculaire de Tax sous l'effet de fortes doses d'expression de p62, nous avons réalisé des expériences de fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles. Pour ces expériences, les cellules HeLa exprimant ou non Tax ainsi qu'un vecteur d'expression de p62 ont subi un protocole de fractionnement cellulaire simple basé sur divers cycles de centrifugation afin de séparer les fractions cytosolique, vésiculaire et nucléaire des cellules (Figure 2.17).

L'analyse par immunoblot de ces différentes fractions confirme tout d'abord les différentes localisations de Tax en condition d'expression endogène de p62, en accord avec l'analyse des marqueurs Lamine B1, Tubuline- α et Rab5, spécifiques des fractions nucléaire, cytosolique et vésiculaire respectivement. Ainsi, nous pouvons voir que Tax est présent en fortes doses dans la

fraction nucléaire, mais également dans le cytosol et dans la fraction vésiculaire, cette dernière forme correspondant très probablement à la fraction de Tax recrutée au niveau des radeaux lipidiques notamment. En conditions de sur-expression de p62, le niveau de Tax baisse globalement dans tous les compartiments. Une analyse comparative plus fine de chaque compartiment nous permet de voir que, si la fraction cytosolique de Tax semble disparaître presque totalement, les fractions vésiculaire et nucléaire de Tax sont moins touchées par cette déplétion, leur niveau baissant de moins de 50 % (Figure 2.17B).

Ces expériences démontrent que le phénomène de déplétion de Tax en sur-expression de p62 est une déplétion préférentiellement cytosolique. Sans suffire à le confirmer définitivement, cet élément renforce l'hypothèse d'une séquestration vésiculaire de Tax en présence de fortes doses de p62 exprimées par la cellule.

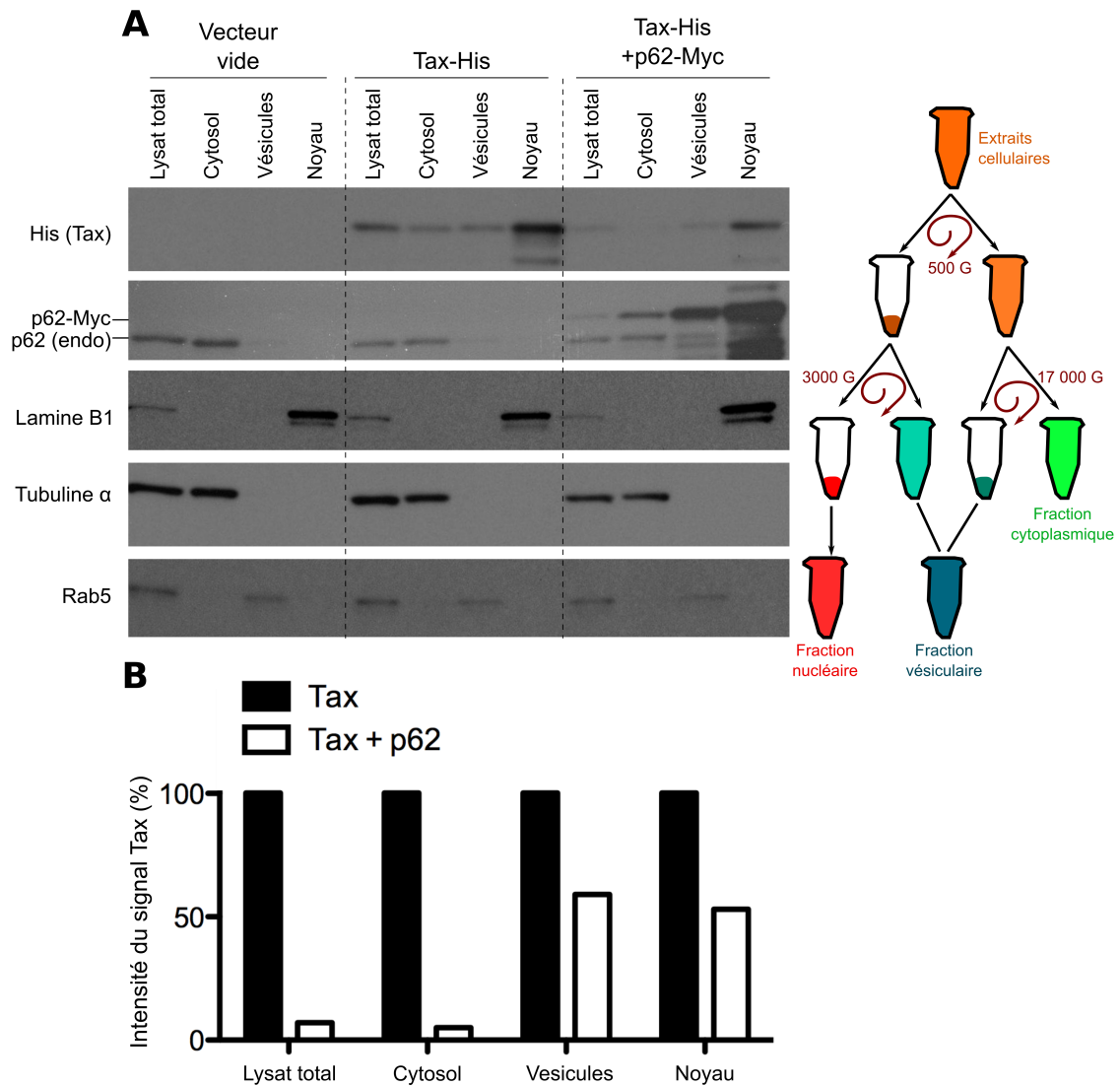


FIGURE 2.17 – La déplétion de Tax en condition de sur-expression de p62 est principalement cytosolique

(A-B) Des cellules de la lignée HeLa ont été transfectées ou non par un vecteur d'expression de Tax-His ou un vecteur d'expression de p62-Myc, comme indiqué. Les cellules ont ensuite été lysées et ont subi un protocole de fractionnement par centrifugations différentielles permettant de séparer les fractions cytosolique, vésiculaire et nucléaire comme indiqué. (A) Les différents extraits de fractionnement ainsi que les lysats totaux ont été analysés par immunoblots spécifiques de la protéine p62 et de l'étiquette His, ainsi qu'à l'aide de divers marqueurs de fractionnement (Lamine B1, marqueur nucléaire; Tubuline- α , marqueur cytosolique et Rab5, marqueur vésiculaire). (B) Une quantification des différents signaux obtenus en immunoblot a été effectuée. L'intensité du signal de détection de la protéine Tax est représentée ici pour chaque compartiment en étant normalisée par rapport à la condition exprimant uniquement Tax (sans p62 ectopique). Immunoblot représentatif de trois expériences indépendantes.

c) **La déplétion de Tax par p62 est indépendante de la machinerie autophagique canonique** Dans le but de caractériser la nature autophagique ou non de cette déplétion, nous avons voulu tester l'effet d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale sur cette déplétion. Pour cela, des cellules HeLa exprimant Tax ainsi qu'une dose élevée de la protéine p62 ont été traitées avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases lysosomales que sont l'E64d et la pepstatine (Figure 2.18). Le traitement par ces inhibiteurs s'accompagne d'une augmentation du niveau de p62 détecté en immunoblot, ce qui suggère que la dégradation autophagique est bien inhibée. Ces expériences montrent que le traitement par ces inhibiteurs est à l'origine d'une restauration de la détection de Tax même en condition de sur-expression de p62. Contrairement aux expériences précédentes, ces résultats suggèrent une dégradation de Tax en sur-expression de p62. Nous reviendrons sur cette apparente contradiction dans la discussion.

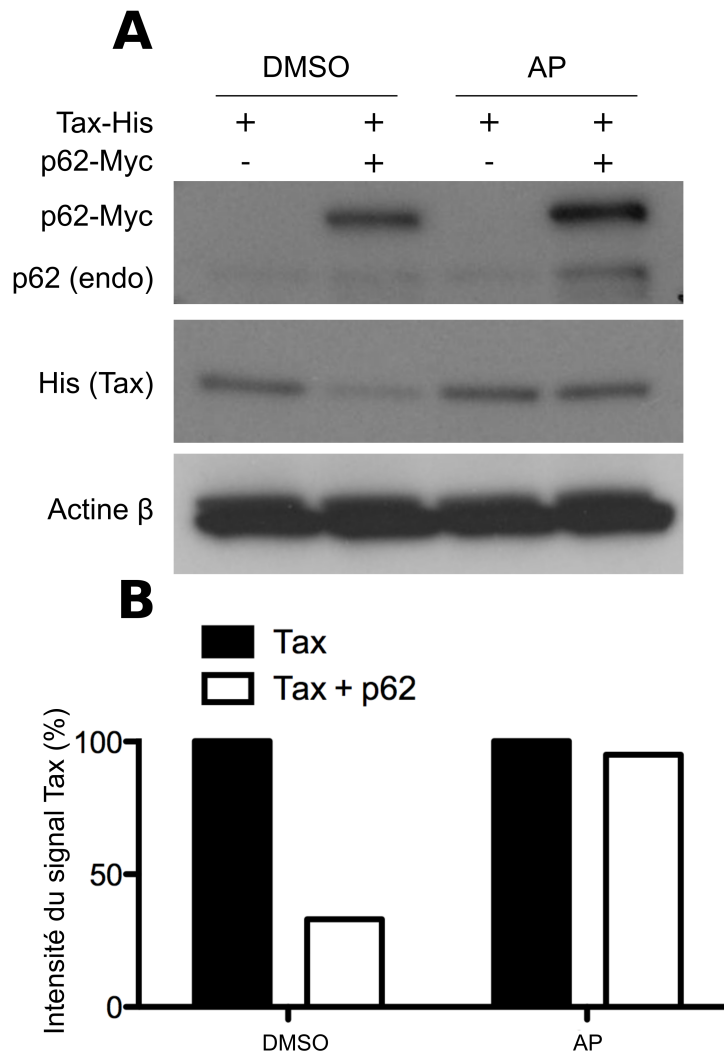


FIGURE 2.18 – L’inhibition de la dégradation lysosomale restaure la détection de Tax en sur-expression de p62

(A-B) Des cellules de la lignée HeLa ont été transfectées ou non par un vecteur d’expression de Tax-His ou un vecteur d’expression de p62-Myc, comme indiqué. (A) Les cellules ont été traitées pendant 22 h, soit avec du DMSO (condition DMSO), soit avec un cocktail des inhibiteurs lysosomaux E64d et pepstatine (condition AP) avant d’être lysées en tampon Ripa puis analysées par immunoblot spécifique de p62 et de l’étiquette His. (B) Une quantification des différents signaux obtenus en immunoblot a été effectuée. L’intensité du signal de détection de la protéine Tax est représentée ici pour chaque compartiment en étant normalisée par rapport à la condition exprimant uniquement Tax (sans p62 ectopique).

Afin de déterminer l’implication de la machinerie autophagique dans cette déplétion de Tax observée en sur-expression de p62, nous avons réalisé des expériences en réprimant l’expression des facteurs autophagiques ATG7, AT5 et BECN1 à l’aide de siARN spécifiques (Figure 2.19). Pour ces expériences, le niveau protéique de Tax détecté après lyse au tampon Ripa ainsi que

l'activation de NF- κ B par Tax ont été étudiés, respectivement par immunoblot (Figure 2.19A, C, E) et à l'aide de rapporteurs luciférase (Figure 2.19B, D, F).

La déplétion protéique de Tax sous l'effet de la sur-expression de p62 est ici observée en conditions de répression de l'expression génétique des facteurs ATG7, ATG5 ou BECN1, sans différence significative en comparaison des conditions traitées avec des siARN aspécifiques (siCTRL). Parallèlement, nous observons une inhibition fonctionnelle de l'activité de Tax sur la voie NF- κ B par la sur-expression de p62 dans toutes ces conditions, sans que la répression des facteurs autophagiques ATG7, ATG5 ou BECN1 ne soit porteuse d'un effet significatif.

Ces expériences montrent que la déplétion de Tax observée lors de l'expression de fortes doses de p62 est indépendante des facteurs ATG7, ATG5 et BECN1 de la machinerie autophagique canonique.

Nous avons donc vu que la sur-expression de p62 provoque une déplétion cytosolique de Tax, qui semble ne pas reposer significativement sur la dégradation de ce dernier. À ce stade, la nature autophagique de ce phénomène n'est pas définitivement établie. Aussi avons-nous voulu caractériser l'effet de l'activation de l'autophagie sur Tax, afin de déterminer si les mêmes phénomènes sont observables.

III. DÉPLÉTION DE TAX EN SUR-EXPRESSION DE P62

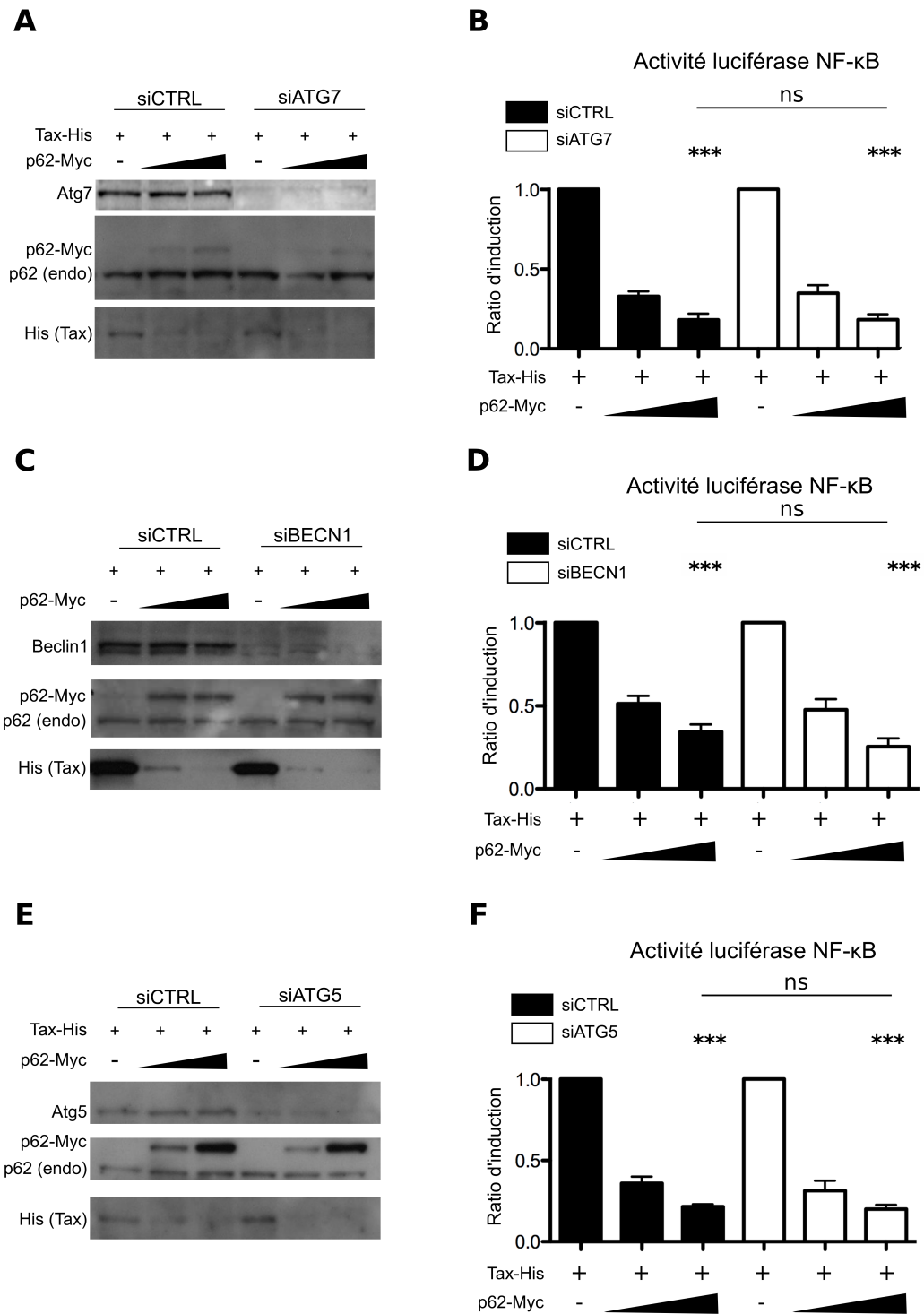


FIGURE 2.19 – L'inhibition génétique de la machinerie autophagique est sans effet sur la déplétion de Tax sous effet de p62

Légende page suivante

(**B, D, F**) Des cellules HEK 293T ont été transfectées par des siARN spécifiques des gènes *ATG7*, *ATG5*, *BECN1* (siATG7, siATG5, siBECN1) ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d’être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par un vecteur d’expression de Tax-His, diverses doses d’un vecteur d’expression de p62-Myc et un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l’activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport aux conditions sans p62 ectopique correspondantes. Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard et ont été analysées par ANOVA monofactorielle, suivie par des test *post-hoc* selon la formule de Bonferroni pour comparer les moyennes entre elles (***, $p < 0,005$; ns, $p > 0,05$). (**A, C, E**) Les lysats cellulaires ont également été analysés par immunoblot spécifique des facteurs ATG7, ATG5, BECN1, de la protéine p62 et de l’étiquette His.

C. Effets de l’activation de l’autophagie sur Tax

La description d’une déplétion de Tax lors de la sur-expression d’un récepteur autophagique nous a amenés à nous pencher sur les conséquences de l’autophagie en elle-même sur Tax. Une précédente étude ayant suggéré que Tax est une cible autophagique, nous avons voulu caractériser plus précisément l’impact d’une activation de l’autophagie sur Tax [Tang et al., 2013]. Pour ce faire, nous avons réalisé plusieurs expériences utilisant le jeûne cellulaire pour activer le flux autophagique. Cette activation peut être obtenue en cultivant les cellules dans un milieu pauvre en nutriments, induisant une activation générale des voies macro-autophagiques en passant par le voie mTOR. Nous utilisons ici la culture de cellules pendant 6 heures dans le milieu HBSS (pour *Hank’s Balanced Salt Solution*) pour obtenir cette activation.

a) Tax colocalise fortement avec p62 en condition d’activation de l’autophagie par le jeûne cellulaire Le recrutement de Tax au niveau de structures autophagiques a tout d’abord été caractérisé en quantifiant la colocalisation entre Tax et p62 à l’aide d’immunomarquages fluorescents comme réalisé précédemment (Figure 2.20). Les cellules cultivées en milieu HBSS présentent, outre un changement morphologique global, de grandes modifications du profil de localisation de p62, qui forme des amas péri-nucléaires déjà décrits dans la littérature dans ces conditions [Gao et al., 2010]. Dans les cellules exprimant Tax, le signal Tax colocalise fortement avec p62. Une quantification informatique de la colocalisation des deux signaux réalisée sur plusieurs cellules montre une augmentation significative de la colocalisation des signaux Tax et p62 en condition d’activation de l’autophagie par le jeûne cellulaire (Figure 2.20).

Ces résultats sont très proches de ceux obtenus en condition de sur-expression de p62, et vont dans le sens d’une prise en charge autophagique de Tax.

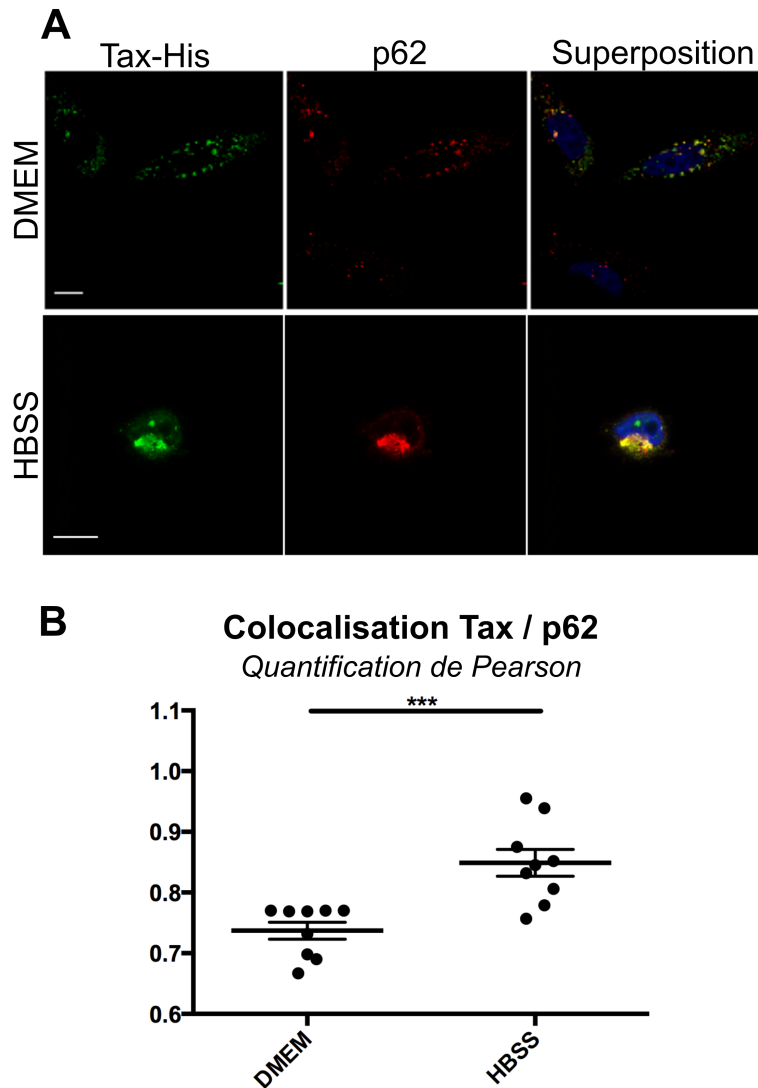


FIGURE 2.20 – Tax colocalise fortement avec p62 en condition d’activation de l’autophagie

(A) Des cellules de la lignée HeLa exprimant un vecteur d’expression de Tax-His ont été cultivées pendant 6 heures en milieu classique DMEM ou en milieu pauvre en nutriments HBSS, comme indiqué. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont subi un marquage immunofluorescent spécifique de p62 (en rouge) et de l’étiquette His (en vert). Un marquage nucléaire a également été réalisé en utilisant du DAPI (en bleu). Barres d’échelle = 10 μ m. (B) La colocalisation entre les marquages Tax et p62 a été quantifiée pour plusieurs cellules, en déterminant le coefficient de Pearson après détermination automatique du seuil de détection à l’aide de l’algorithme de Coste (le plugin *JACoP* du logiciel *ImageJ* a été utilisé [Abràmoff et al., 2004]). Les résultats d’une dizaine de cellules sont représentés, ainsi que leur moyenne et la déviation standard et les données ont été analysées par test de Mann-Whitney bi-directionnel (***, $p < 0,005$).

b) **La déplétion de Tax en condition de jeûne cellulaire n'est pas due à un mécanisme autophagique canonique** Dans le but de caractériser la potentielle prise en charge autophagique de Tax, des cellules exprimant Tax cultivées en milieu DMEM (Nutriments +) ou HBSS (Nutriments -) ont été analysées par immunoblot (Figure 2.21). Afin de déterminer le caractère canonique ou non canonique de cette éventuelle prise en charge, ces cellules ont été préalablement traitées par des siARN aspécifiques (siCTRL) ou spécifiques du facteur ATG7 (siATG7).

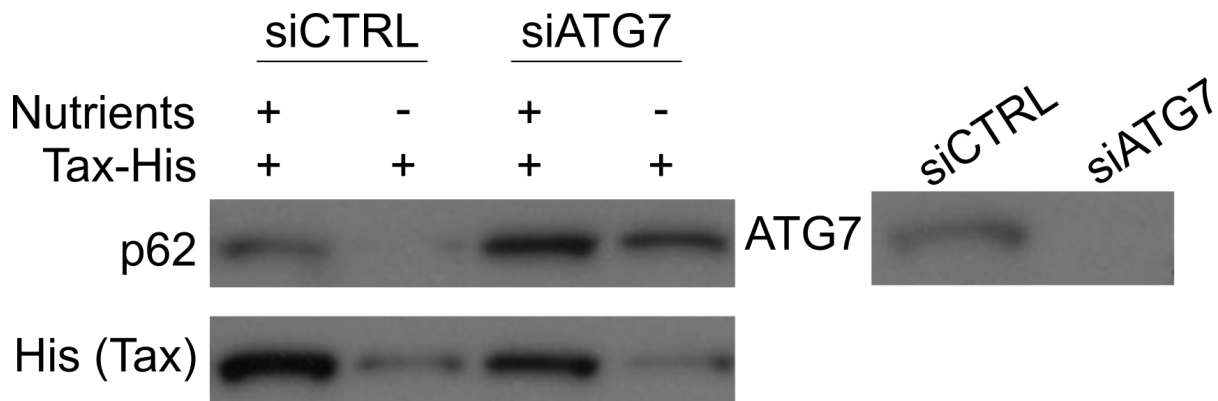


FIGURE 2.21 – Tax est déplété en condition d'activation de l'autophagie

Des cellules de la lignée HeLa ont été transfectées par des siARN spécifiques du gène *ATG7* (siATG7) ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d'être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par un vecteur d'expression de Tax-His. Après 24 h comprenant 6 h d'incubation avec du milieu HBSS pour les conditions *Nutriments -*, les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot spécifique de la protéine p62 et de l'étiquette His. L'analyse par immunoblot de la protéine ATG7 dans des cellules traitées par les siARN aspécifiques (siCTRL) ou spécifiques de ATG7 (siATG7) sont représentées dans le panel de droite.

Ces expériences montrent que l'activation de l'autophagie en condition de jeûne cellulaire, attestée par la diminution du signal p62, résulte en une déplétion de Tax, confirmant que Tax est une cible autophagique. En condition de répression génétique du facteur ATG7, la déplétion de Tax est toujours observée.

Ces résultats convergent vers la conclusion que Tax est une cible autophagique, dont on observe une déplétion en immunoblot lors de l'activation de l'autophagie par le jeûne cellulaire. Cette déplétion est indépendante du facteur ATG7, et semble donc être due à un processus différent de la voie canonique de l'autophagie. Il est intéressant de noter les similarités entre ces résultats et ceux obtenus en condition de sur-expression de p62.

D. Bilan : effet dual de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax

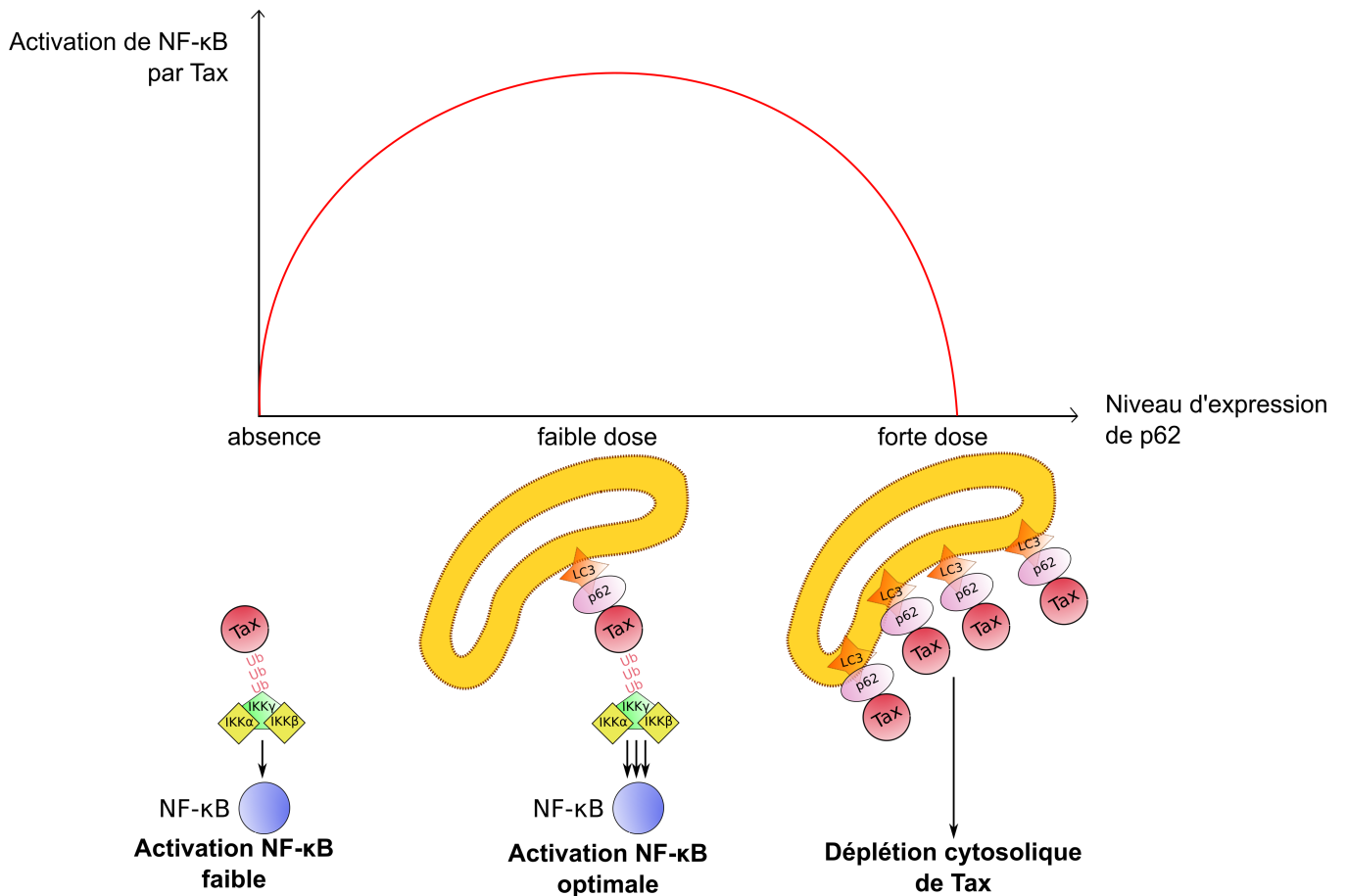


FIGURE 2.22 – Modèle proposé pour l'effet dual de p62 sur Tax

À l'issue des expériences de cette partie, nous pouvons élargir notre vision sur les interactions fonctionnelles entre Tax et p62. Les expériences réalisées en condition de sur-expression de p62 montrent que l'effet de p62 sur Tax est dual et dépendant de la dose. Ainsi, si p62 porte un effet potentiateur pour des doses proches de l'endogène, nous avons mis en évidence l'existence d'un mécanisme inhibiteur porté par de fortes doses de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Cet effet inhibiteur s'accompagne d'une déplétion cytosolique de Tax, indépendante de l'autophagie canonique (Figure 2.22).

Cette déplétion en présence de fortes doses de p62 est très similaire à ce que l'on peut observer lors de l'activation de l'autophagie par le jeûne cellulaire. En effet, dans ces conditions, on observe également une déplétion de Tax indépendamment du facteur autophagique canonique ATG7. Bien que des études plus approfondies soient nécessaires pour conclure, ces similitudes

suggèrent l'existence d'une prise en charge autophagique non canonique du facteur Tax par p62.

IV Étude des autres membres de la famille SLR

En parallèle de l'étude des interactions physiques et fonctionnelles entre Tax et p62, nous avons également étudié certains aspects des interactions entre Tax et les autres membres de la famille des SLR.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les conclusions faites sur l'importance de l'autophagie pour la potentialisation par p62 de l'activation de NF- κ B médiée par Tax sont généralisables à l'OPTN, SLR déjà caractérisé comme un partenaire de Tax [Journo et al., 2009]. Puis nous avons réalisé de premières expériences préliminaires dans le but de déterminer si les SLR NDP52 et NBR1, non-encore caractérisés comme des partenaires de Tax, sont capables d'interagir physiquement et fonctionnellement avec Tax.

A. Implication de l'autophagie dans la potentialisation par OPTN de l'activation de NF- κ B médiée par Tax

a) Localisation autophagique des complexes Tax / OPTN La localisation des complexes Tax / OPTN a été caractérisée dans de précédentes études, et décrite comme péri-golgienne [Journo et al., 2009]. Cette localisation n'étant pas incompatible avec une localisation autophagique, comme nous l'avons montré pour le cas de p62, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure ces complexes étaient localisés ou non au niveau de membranes autophagiques.

Pour ce faire, le modèle des cellules HeLa GFP-LC3 a été utilisé, en comparant les localisations des signaux OPTN, GFP-LC3 et Tax-His dans des cellules HeLa GFP-LC3 préalablement transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His (Figure 2.23). La comparaison des signaux Tax, OPTN et LC3 dans ces conditions expérimentales montre l'existence de structures de triple colocalisation Tax / OPTN / LC3, suggérant l'existence de complexes Tax / OPTN localisés au niveau de membranes autophagiques. Cette colocalisation n'est cependant pas systématique, comme c'est le cas pour p62.

Ces expériences montrent que certains complexes Tax / OPTN sont localisés au niveau de membranes autophagiques positives pour LC3, et soulèvent la question de l'implication de ces membranes dans la potentialisation par OPTN de l'activation de la voie NF- κ B par Tax.

Cellules de lignée HeLa GFP-LC3

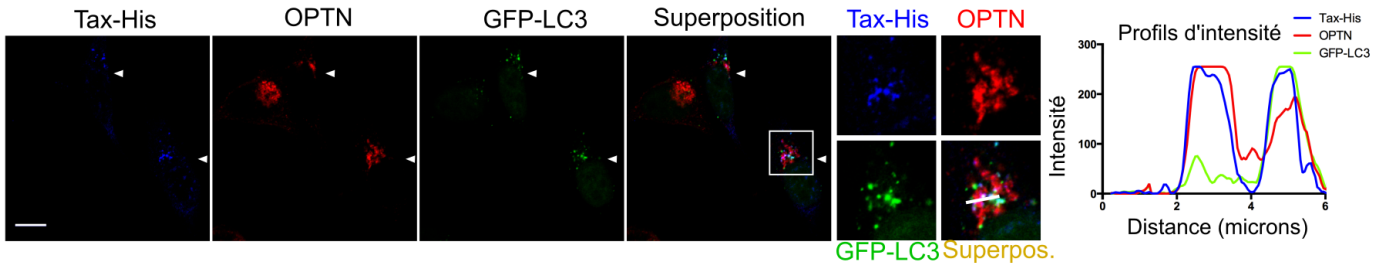


FIGURE 2.23 – Des complexes Tax / OPTN localisent au niveau de structures autophagiques riches en LC3

Des cellules de la lignée HeLa GFP-LC3 transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immunofluorescent spécifique de l'OPTN (en rouge) et de l'étiquette His (en bleu). Le signal vert correspond aux protéines GFP-LC3. Les profils d'intensité sont réalisés le long du profil indiqué dans le zoom. Les flèches indiquent les cellules transfectées par Tax-His. Barre d'échelle = 10 μ m.

b) Implication de l'autophagie dans la potentialisation de l'activité de Tax par OPTN Dans le but de déterminer l'éventuel impact fonctionnel de l'autophagie sur la potentialisation par OPTN de l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax, nous avons appliqué la même méthodologie expérimentale que précédemment pour p62. Ainsi, des cellules 293T ont été transfectées par des vecteurs exprimant Tax-His ainsi qu'un vecteur d'expression de VSV-OPTN. Par cette expérience, il est possible de visualiser directement l'effet potentiateur porté par OPTN sur l'activité de Tax (Figure 2.24). Dans des conditions de répression génétique du facteur autophagique ATG7, cette activité potentiatrice portée par OPTN est annulée.

Ces expériences démontrent l'implication du flux autophagique ainsi que des membranes autophagiques dans la potentialisation par OPTN de l'activité de Tax, de manière similaire à p62.

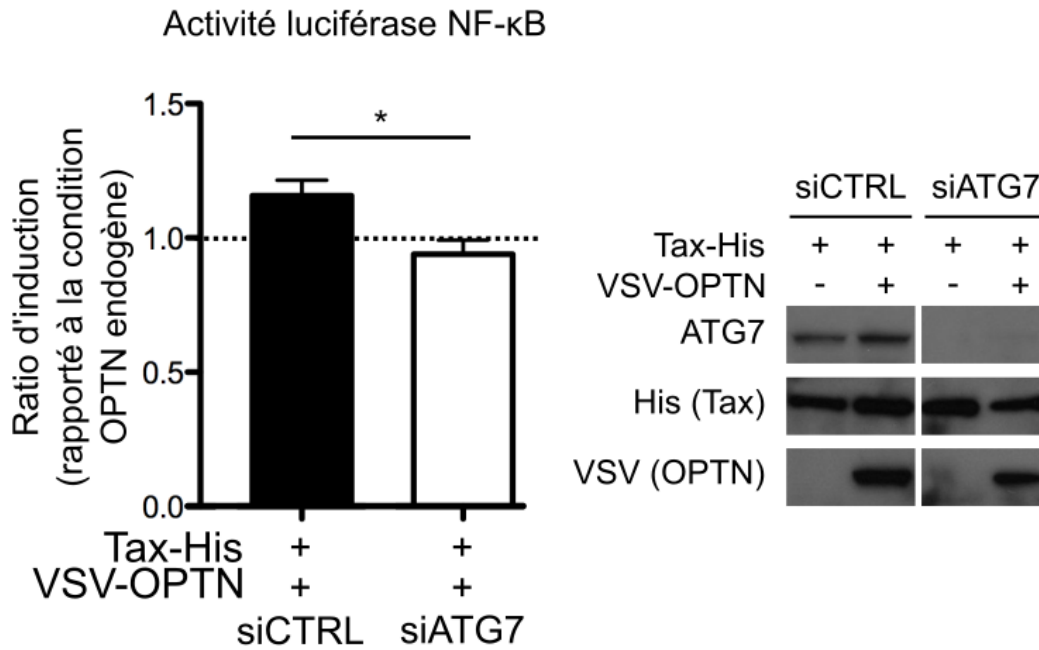


FIGURE 2.24 – L'autophagie est impliquée dans la potentialisation par OPTN de l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax

Des cellules HEK 293T ont été transfectées par des siARN spécifiques du gène *ATG7* ou aspécifiques (siCTRL) pendant 24 h, avant d'être transfectées par les mêmes siARN ainsi que par un vecteur d'expression VSV-OPTN, un vecteur d'expression Tax-His et un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par rapport à la condition p62 endogène correspondante. Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard et ont été analysées par ANOVA monofactorielle, suivie par des test *post-hoc* selon la formule de Bonferroni pour comparer les moyennes entre elles (*, $p < 0,05$). Les lysats cellulaires ont également été analysés par immunoblot spécifique des facteurs ATG7, et des étiquettes VSV et His.

B. Étude préliminaire de l'interaction entre Tax, NDP52 et NBR1

Afin de compléter cette étude, des expériences préliminaires ont été menées pour caractériser les interactions physiques et fonctionnelles entre Tax et les deux derniers SLR non caractérisés que sont NBR1 et NDP52.

a) Interaction Tax / NBR1 Dans un premier temps, l'interaction entre Tax et NBR1 a été étudiée de la même manière que pour p62, en caractérisant la colocalisation et l'interaction entre ces deux facteurs. La colocalisation a été étudiée dans un modèle de cellules HeLa co-transfectées par une construction de NBR1-EGFP, utilisée en absence d'anticorps spécifique de NBR1 en notre possession, et un vecteur d'expression de Tax-His (Figure 2.25A). Les immunomarquages fluorescents réalisés sur ces cellules montrent que le signal Tax est large-

IV. ÉTUDE DES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE SLR

ment relocalisé dans les cellules exprimant la construction NBR1-EGFP, en comparaison avec le marquage classique de Tax observable dans les expériences présentées précédemment. Cette relocalisation de Tax dans un contexte de sur-expression de NBR1 suggère fortement une interaction entre ces deux facteurs. L'analyse ne saurait être poussée plus loin, le signal de NBR1 étant probablement modifié par les effets conjugués de la sur-expression et de l'étiquette EGFP.

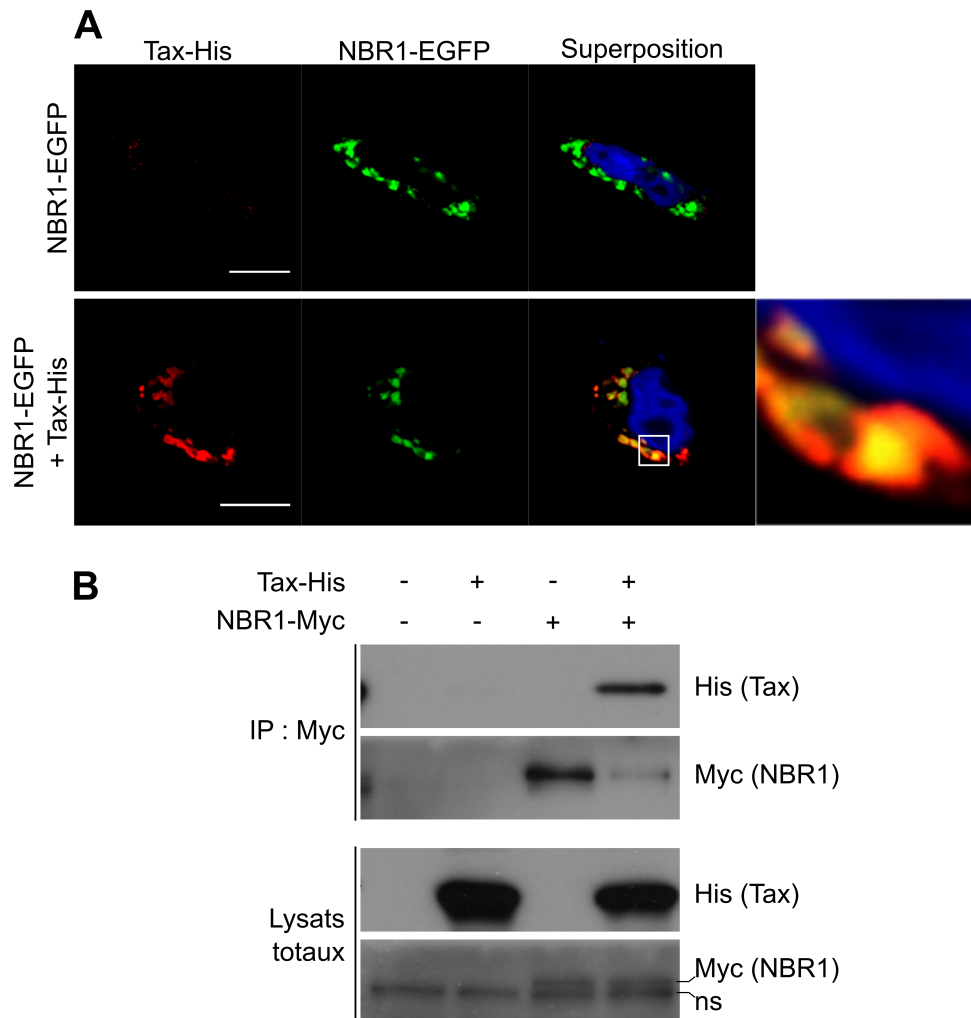


FIGURE 2.25 – **Tax interagit avec NBR1**

(A) Des cellules de la lignée HeLa transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ainsi qu'un vecteur d'expression de NBR1-EGFP ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immunofluorescent spécifique de l'étiquette His (en rouge). Le signal vert correspond aux protéines NBR1-EGFP. Un marquage nucléaire a également été réalisé avec du DAPI (en bleu). Barres d'échelle = 10 μ m. (B) Des cellules HeLa transfectées ou non par des vecteurs d'expression des protéines Tax-His et NBR1-Myc ont été lysées avant de subir une immuno-précipitation spécifique de l'étiquette Myc. Les extraits ont ensuite été analysés par immunoblots spécifiques des étiquettes His et Myc.

L'interaction entre Tax et NBR1 a été étudiée par le biais d'immuno-précipitations spécifiques de l'étiquette Myc réalisée sur des extraits issus de cellules HeLa co-transfectées par des vecteurs d'expression des protéines Tax-His et NBR1-Myc (Figure 2.25B). Ces expériences montrent que, dans ces conditions expérimentales, Tax est détecté après la précipitation spécifique de NBR1, signe d'une interaction entre ces deux protéines.

b) Interaction entre Tax et NDP52 La même stratégie expérimentale a été utilisée pour étudier l'interaction entre Tax et NDP52. Les marquages immunofluorescents spécifiques des protéines Tax-His et NDP52-FLAG réalisés sur des cellules HeLa co-transfectées par des vecteurs d'expression de ces deux protéines montrent une colocalisation entre ces deux signaux (Figure 2.26A). Cette colocalisation suggère une interaction entre ces deux protéines.

L'interaction entre les protéines Tax-His et NDP52-FLAG a été caractérisée par immuno-précipitation spécifique de l'étiquette FLAG effectuée sur des extraits des cellules co-exprimant ces constructions (Figure 2.26B). Dans ces conditions expérimentales, la précipitation spécifique de NDP52 aboutit à une détection de Tax, montrant une interaction de ces deux facteurs dans ces cellules.

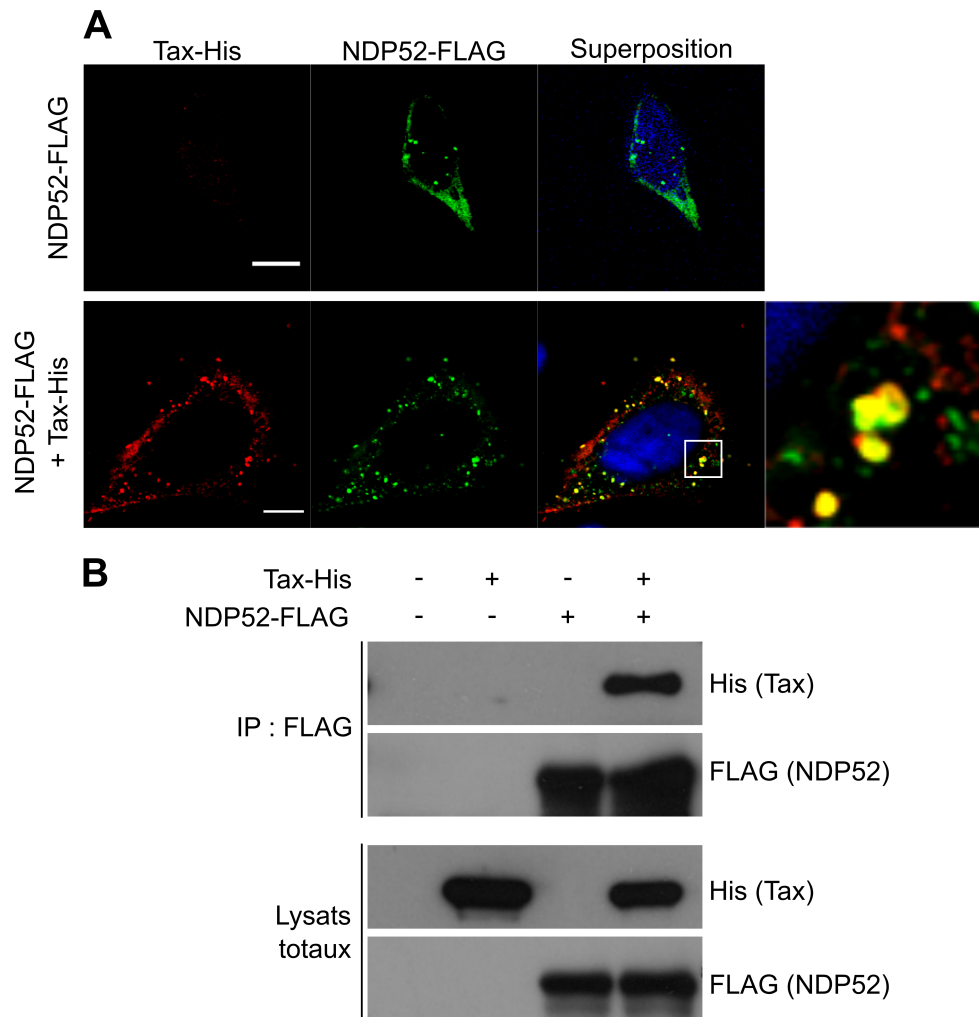


FIGURE 2.26 – Tax interagit avec NDP52

(A) Des cellules de la lignée HeLa transfectées par un vecteur d'expression de Tax-His ainsi qu'un vecteur d'expression de NDP52-FLAG ont été fixées et perméabilisées avant de subir un marquage immunofluorescent spécifique des étiquettes FLAG (en vert) et His (en rouge). Un marquage nucléaire a également été réalisé avec du DAPI (en bleu). Barres d'échelle = 10 μ m. (B) Des cellules HeLa transfectées ou non par des vecteurs d'expression des protéines Tax-His et NDP52-FLAG ont été lysées avant de subir une immuno-précipitation spécifique de l'étiquette FLAG. Les extraits ont ensuite été analysés par immunoblots spécifiques des étiquettes His et FLAG.

C. Étude préliminaire des interactions fonctionnelles entre NDP52, NBR1 et l'activation de NF- κ B médiée par Tax

L'interaction entre Tax et les facteurs NDP52 et NBR1 étant suggérée par nos résultats préliminaires exposés précédemment, nous avons esquissé l'étude de possibles interactions fonctionnelles entre ces facteurs et l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax.

Dans cette optique, les conséquences de la sur-expression des facteurs NBR1 et NDP52 sur cette activation de NF- κ B par Tax ont été étudiées à l'aide de rapporteurs luciférase NF- κ B dont l'activité a été quantifiée dans des cellules exprimant Tax ainsi que diverses doses des facteurs NBR1 et NDP52 (Figure 2.27). Dans les deux cas, ces résultats préliminaires montrent un effet dual de ces deux SLR sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. En effet, l'évolution de cette activité NF- κ B en fonction de la dose d'expression de NBR1 et NDP52 montre dans les deux cas, des doses résultant en une potentialisation et des doses plus élevées induisant une répression. Les effets potentiateurs de NBR1 et NDP52 sont observés pour des ratios $\frac{SLR}{Tax}$ compris entre 0,2 et 0,5.

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'interaction entre Tax et les SLR, ainsi que l'implication de ces derniers dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax sont des caractéristiques générales partagées par tous les SLR.

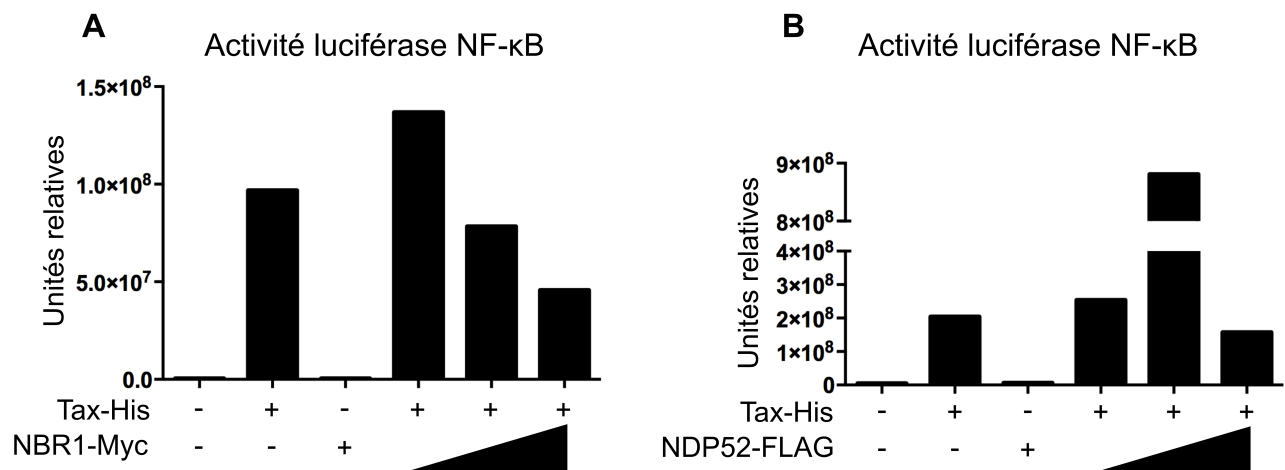


FIGURE 2.27 – NBR1 et NDP52 portent des effets fonctionnels sur l'activation de NF- κ B médiée par Tax

(A) Des cellules HEK 293T ont été transfectées ou non par différentes doses de vecteurs d'expression des protéines Tax-His et NBR1-Myc, ainsi que par un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et est représentée en valeurs relatives. Les données d'une expérience représentative sont représentées. (B) Des cellules HEK 293T ont été transfectées ou non par différentes doses de vecteurs d'expression des protéines Tax-His et NDP52-FLAG, ainsi que par un gène rapporteur luciférase NF- κ B. Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée et est représentée en valeurs relatives. Les données d'une expérience représentative sont représentées. Les analyses en immunoblots correspondant à ces conditions n'ont pas été réalisées.

CHAPITRE 3

Discussion

Les résultats obtenus lors du travail de thèse et exposés précédemment ont permis de caractériser plus précisément les interactions physiques et fonctionnelles entre l'activation de la voie NF- κ B par la protéine virale Tax et les voies de la macro-autophagie cellulaire, notamment par le biais des récepteurs autophagiques de la famille des SLR. Le rôle des récepteurs SLR OPTN et TAX1BP1 dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax est clairement établi dans la littérature, bien que les liens avec leur fonction autophagique n'aient pas été étudiés [Journo et al., 2009]. Parallèlement, les données faisant état d'interactions entre Tax et la macro-autophagie s'accumulent ces dernières années [Tang et al., 2013, Ren et al., 2015]. Ainsi, notre objectif était d'étudier l'implication potentielle d'autres récepteurs SLR dans cette activité de Tax, en nous penchant notamment sur un membre du sous-groupe évolutif des SLR contenant p62 et NBR1. L'un des objectifs était de remettre ces potentielles interactions dans le contexte du flux autophagique. En effet, le rôle autophagique de OPTN et TAX1BP1 ayant été décrit après leur rôle dans la signalisation par Tax, cette approche n'avait jamais été utilisée.

Au cours de notre étude, centrée sur le cas du récepteur p62, nous avons mis en évidence une interaction directe et indépendante de l'ubiquitine entre Tax et p62, ainsi que la localisation des complexes Tax / p62 au niveau de structures riches en LC3. Au moins une partie de ces complexes sont également associés avec le facteur régulateur de la voie NF- κ B IKK γ .

D'un point de vue fonctionnel, nous avons démontré que p62 porte un effet dual et dépendant du niveau d'expression sur l'activation de NF- κ B par Tax. En effet, à des doses endogènes d'expression, p62 porte un effet de potentialisation de cette activation, alors que la sur-expression de p62 réprime l'activation de NF- κ B par Tax. L'exploration des mécanismes de la potentialisation portée par p62 a montré qu'elle est en lien avec la machinerie autophagique, la répression de facteurs autophagiques abolissant totalement cet effet porté par p62. Les mécanismes inhibiteurs n'ont pas été totalement élucidés, mais nous avons montré que la sur-expression de p62 promeut une déplétion cytosolique de Tax qui s'apparente à une séquestration vésiculaire, indépendamment des principaux facteurs autophagiques canoniques.

Nous avons ensuite cherché à étendre cette étude aux autres membres des SLR. Tout d'abord, nous avons montré que, comme pour p62, la potentialisation de l'activation de la voie NF- κ B portée par OPTN était liée au flux autophagique. Parallèlement, des données préliminaires suggèrent que Tax interagit physiquement et fonctionnellement avec les SLR NDP52 et NBR1, suggérant que l'interaction avec Tax est une caractéristique commune à tous les récepteurs SLR.

I Mécanisme de potentialisation par p62 de l'activation de NF- κ B par Tax

Dans le cadre de l'exploration des interactions entre l'activation de NF- κ B par Tax et la voie autophagique, nous avons tout d'abord étudié le récepteur p62. Nous avons identifié p62 comme un nouveau partenaire de Tax, avant de caractériser ses interactions avec la voie NF- κ B.

A. Régulation de la localisation du signalosome Tax / IKK γ au niveau des membranes autophagiques

Nos résultats montrent que les complexes Tax / p62 sont situés au niveau de structures autophagiques enrichies en facteur LC3, situées en position péri-golgienne. Ces structures correspondent très probablement à des membranes autophagiques, bien que nous ne l'ayons pas démontré de manière définitive. Dans cette optique, il nous faudrait réaliser des expériences de microscopie électronique afin de pouvoir identifier les membranes autophagiques, reconnaissables à leur double membrane. L'usage de la microscopie corrélative nous permettrait de conclure quant à la localisation des complexes Tax / p62 sur de telles membranes.

En poursuivant la caractérisation de ces complexes, il est apparu que le facteur IKK γ était présent dans au moins certains de ces complexes. La description d'une localisation autophagique peut sembler étonnante au regard de la littérature, mais comme nous l'avons vu précédemment, la localisation de Tax est définie comme péri-golgienne. Cette zone cellulaire est large et inclut notamment le centrosome et potentiellement un certain nombre d'autres membranes golgiennes et réticulaires. Il est maintenant établi que Tax est recruté au niveau de radeaux lipidiques membranaires, notamment par le facteur CADM1 [Pujari et al., 2015]. Ce facteur n'étant pas décrit comme ayant une localisation autophagique, cela ouvre la question de la régulation de la localisation du signalosome Tax / IKK γ entre ces radeaux lipidiques et les membranes autophagiques. Le facteur p62 est localisé dans le cytoplasme ce qui permet d'envisager un rôle de p62 dans cette régulation, qui pourrait participer au recrutement du signalosome sur des membranes autophagiques [Bjørkøy et al., 2005].

La manière la plus simple de concilier ces deux localisations du signalosome Tax / IKK γ est de les considérer de manière séquentielle. Cette hypothèse est rendue la plus parcimonieuse par notre constatation du caractère facultatif de p62 pour la formation des complexes Tax / IKK γ , qui rend l'hypothèse d'un assemblage du signalosome au niveau des membranes autophagiques moins probable, ou en tout cas très minoritaire s'il existe. Plusieurs *scenarii* peuvent alors être envisagés.

A.1. Hypothèse d'un recrutement du signalosome depuis le compartiment golgien vers les membranes autophagiques

La description dans la littérature d'une formation du signalosome Tax / IKK γ au niveau de radeaux lipidiques membranaires péri-golgiens est en accord avec nos résultats sur l'absence de nécessité de p62 pour la formation de ces complexes. Si nous considérons donc que ces signalosomes se forment au niveau des radeaux lipidiques golgiens, auxquels Tax est recruté probablement par CADM1 entre-autre, les signalosomes Tax / IKK γ seraient donc recrutés pré-formés au niveau des membranes autophagiques. La façon la plus simple de considérer ce recrutement est d'envisager une mobilité physique du signalosome Tax / IKK γ , qui serait relocalisé depuis ces membranes vers les autophagosomes (Figure 3.1).

L'existence de signalosomes cytosoliques de la voie NF- κ B, comme les POLKADOTS décrits dans les cellules T ouvre l'hypothèse d'un recrutement des complexes Tax / IKK γ par ce genre de structures cytosoliques [Paul and Schaefer, 2013]. Il est à noter que les interactions entre les POLKADOTS et les membranes autophagiques n'ont pas été clairement déterminées. Ainsi, dans cette hypothèse, les complexes Tax / IKK γ , préalablement constitués et ancrés aux membranes péri-golgiennes par des facteurs comme CADM1, seraient alors transférés sur p62, permettant leur recrutement au niveau des membranes autophagiques, en passant par LC3 comme représenté à la Figure 2.13. Ce recrutement pourrait être direct ou passer par un intermédiaire cytosolique non-ancré à des membranes.

Pour tester expérimentalement cette hypothèse, il nous serait possible de déterminer si l'interaction entre p62 et LC3 est nécessaire au recrutement de Tax au niveau des membranes autophagiques, en utilisant par exemple des mutants p62 Δ LIR exprimés en cellules p62 $^{-/-}$. Certaines études ayant montré que le recrutement de p62 au niveau des membranes autophagiques peut être indépendant de LC3 et passer uniquement par l'oligomérisation de p62, les mêmes études devraient être réalisées avec des mutants p62 Δ PB1, incapables d'oligomériser [Itakura and Mizushima, 2011].

A.2. Hypothèse d'une maturation des membranes golgiennes en membranes autophagiques

Une autre hypothèse est possible, en lien avec la diversité des sources membranaires à l'origine des membranes autophagiques. En effet, la localisation péri-golgienne de ces complexes a mis à jour l'hypothèse que ces membranes correspondraient au compartiment intermédiaire entre le réticulum et l'appareil de Golgi, appelé ERGIC. Ce compartiment étant connu comme un point chaud de lipidation de LC3, c'est un candidat intéressant pour les structures portant les complexes Tax / p62 / LC3 que nous avons décrits. Dans cette optique, les membranes péri-golgiennes recrutant les signalosomes Tax / IKK γ pourraient maturer pour former des membranes autophagiques riches en LC3 (Figure 3.1). Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons tenté d'exploiter des marqueurs du compartiment ERGIC en microscopie, mais sans parvenir à une identification satisfaisante de ce compartiment (nous empêchant de chercher à savoir si nos complexes y étaient localisés).

Cette hypothèse de la maturation des membranes golgiennes positives pour Tax en membranes autophagiques est également alimentée par les résultats de l'équipe du Dr. Hua Cheng, décrivant le recrutement de membres du complexe Beclin1 par Tax au niveau de radeaux lipidiques, ce qui promeut la formation de membranes autophagiques riches en facteur LC3 [Cheng et al., 2012]. En effet, ces travaux suggèrent que Tax promeut la formation de membranes autophagiques au niveau des membranes péri-golgiennes où est situé Tax, sans toutefois chercher à déterminer la présence de Tax au niveau de ces membranes. La mise en commun de nos résultats suggère la possibilité d'un bourgeonnement, médié par Tax, de membranes autophagiques à partir des radeaux lipidiques membranaires auxquels sont recrutés Tax et certains de ses partenaires.

Dans le détail, cette hypothèse apporte de nouvelles possibilités. En effet, ce processus ne reposant plus sur le recrutement direct de Tax par p62, il est possible d'envisager que Tax est ancré aux membranes autophagiques par d'autres facteurs, comme CADM1, et que p62 est ensuite recruté sur Tax, sans servir de point d'ancrage. Dans ce cas de figure, le facteur LC3 serait facultatif au recrutement de Tax aux membranes autophagiques, et p62 serait recruté par Tax, et non l'inverse, ce qui ouvre de nouvelles perspectives fonctionnelles que nous verrons dans la partie suivante.

Notons pour être complet que ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, et qu'il est possible d'envisager une coopération entre l'induction de la formation des membranes

autophagiques par Tax au travers de son interaction avec BECN1 et le recrutement de Tax sur les membranes ainsi formées par l'intermédiaire de p62.

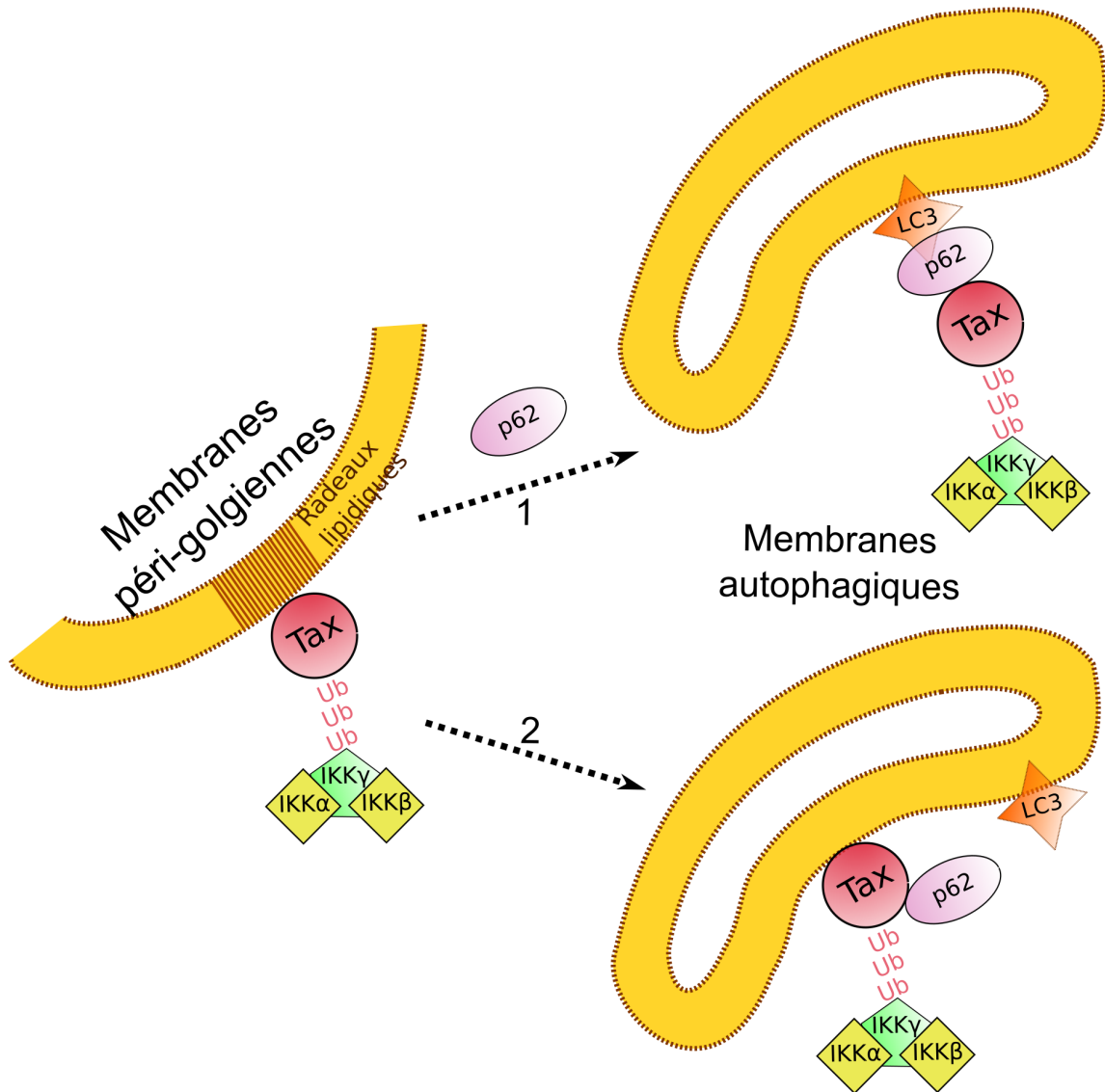


FIGURE 3.1 – Hypothèses de recrutement du signalosome Tax / IKK γ aux membranes autophagiques

Les deux hypothèses principales expliquant le passage du signalosome Tax / IKK γ de membranes péri-golgiennes à des membranes autophagiques et représentées ici sont (1) le recrutement physique du signalosome d'une membrane à l'autre par le biais de p62, (2) la maturation des membranes péri-golgiennes en membranes autophagiques.

Chacune de ces hypothèses aboutit à une configuration différente au niveau de la membrane autophagique.

B. Modèle fonctionnel de la potentialisation par p62 de l'induction de la voie NF- κ B médiée par Tax

Nous avons montré que p62 porte, pour des niveaux d'expression endogènes, un effet potentialisateur sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Cet effet est dépendant de la voie autophagique car il disparaît en conditions de répression génétique du facteur ATG7. À l'issue de notre étude, il semble donc que cette potentialisation soit un résultat de l'interaction de p62 avec Tax au niveau de membranes autophagiques, plusieurs hypothèses pouvant expliquer cet effet.

La première possibilité est celle d'un effet d'échafaudage de la signalisation NF- κ B sous le contrôle de Tax, médié par p62. Cet effet serait un effet d'échafaudage pur, la formation du signalosome étant indépendante de p62. Cette hypothèse s'inscrit dans la lignée des études décrivant un effet d'échafaudage de la signalisation apoptotique au niveau des membranes autophagiques [Young et al., 2012]. Ainsi, les membranes autophagiques pourraient servir de plateforme de signalisation, un lieu cellulaire de recrutement des divers médiateurs de la voie NF- κ B, et p62 serait le facteur permettant d'ancrer le signalosome Tax / IKK γ au niveau de cette plateforme. La potentialisation fonctionnelle observée ainsi serait dépendante d'autres facteurs recrutés sur ces mêmes membranes, constituant un micro-environnement favorable à la signalisation. Cette hypothèse fait également écho aux signalosomes cytosoliques décrits dans l'activation de NF- κ B dans les cellules T et dans lesquels p62 joue également un rôle, bien que la localisation membranaire de ces signalosomes n'ait pas été clairement établie [Paul et al., 2014]. Cette hypothèse est la plus cohérente avec le modèle de recrutement de Tax au niveau des membranes autophagiques par l'intermédiaire de p62 que nous avons développé dans la partie précédente.

Une seconde hypothèse est soulevée par le modèle de la maturation des membranes péri-golgiennes en membranes autophagiques que nous avons évoqué précédemment. Dans ce cas de figure, p62 ne serait pas un médiateur de l'ancrage de Tax au niveau des membranes autophagiques (en d'autres termes, Tax n'est pas recruté par p62), mais serait un médiateur recruté par Tax sur ces membranes (en d'autres termes, Tax recrute p62). Une fois recruté par Tax, p62 pourrait servir d'ancrage à des chaînes de poly-ubiquitine, qui joueraient le rôle de plateforme de recrutement de facteurs importants pour l'activation des kinases IKK, comme les facteurs TAK et TAB (Figure 3.2). La localisation de Tax au niveau de membranes autophagiques faciliterait dans ce modèle l'interaction entre Tax et p62, ce dernier étant enrichi au niveau des membranes

autophagiques. Dans ce cas de figure, p62 jouerait un rôle proche de celui qu'il joue dans l'activation de la voie NF- κ B au sein des cellules T, à savoir structurer des réseaux d'ubiquitine sur lesquels s'ancrent divers médiateurs de la voie. Cette hypothèse met en jeu le caractère ubiquitine-indépendant de l'interaction entre Tax et p62, le domaine UBA de p62 restant libre et totalement disponible pour interagir avec des chaînes de poly-ubiquitine. L'importance de la liaison de p62 aux chaînes d'ubiquitine serait vérifiable en testant les propriétés fonctionnelles du mutant p62 Δ UBA dans l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Une variante à ce modèle est envisageable, en imaginant que l'interaction entre Tax et p62 ne soit pas nécessaire à la potentialisation de l'activation de la voie NF- κ B. Cette hypothèse est testable à l'aide de mutants p62 Δ MIR, n'interagissant pas avec Tax.

La plupart de ces hypothèses, ainsi que l'intégralité de nos résultats, portent sur un mode d'activation de la voie canonique NF- κ B. Il convient de noter que nous n'avons effectué aucune expérience à même d'étudier l'implication de la voie alterne NF- κ B dans notre étude. L'exploration de ce point pourrait venir compléter notre compréhension des interactions fonctionnelles entre Tax et p62. Pour cela, nous pourrions par exemple caractériser la dégradation partielle de l'inhibiteur p100 de la voie alterne NF- κ B en contexte de suppression de l'expression de p62.

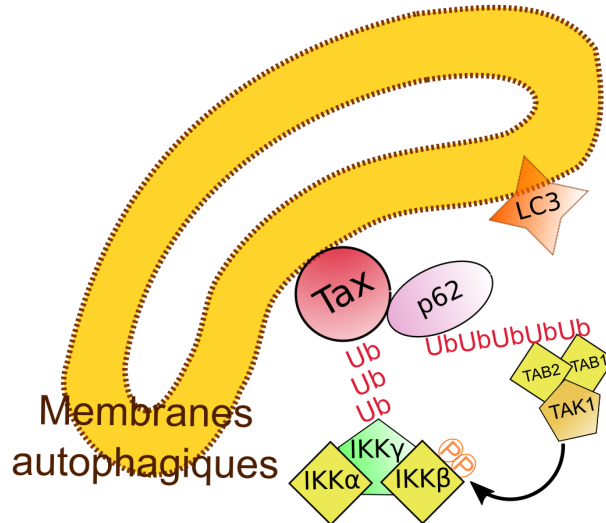


FIGURE 3.2 – Modèle de la potentialisation de la voie NF- κ B par p62 au niveau des membranes autophagiques

L'hypothèse de la maturation des membranes golgiennes en membranes autophagiques suggère un rôle pour p62 différent d'un rôle d'ancrage de Tax à ces membranes. Ici, nous illustrons une possibilité de recrutement par p62 de chaînes d'ubiquitine servant de plateformes de recrutement de médiateurs augmentant la signalisation NF- κ B.

Enfin, il convient de replacer toutes ces considérations fonctionnelles liées à p62 dans un contexte plus large, et notamment dans le contexte de la famille des SLR. En effet, nous avons vu que p62 partage de nombreux points communs fonctionnels avec OPTN et TAX1BP1, notamment de par leur capacité à potentialiser l'activation de la voie NF- κ B par Tax. À partir de ces éléments, et avant même de nous pencher sur les autres membres de la famille des SLR, il est possible de formuler l'hypothèse d'une certaine redondance fonctionnelle entre les différents membres de cette famille, au regard de l'activation de la voie NF- κ B en présence de Tax, ainsi qu'en contexte non-infectieux. Il serait intéressant de déterminer notamment si l'interaction entre Tax et p62 est nécessaire pour l'effet de p62 sur Tax comme pour le recrutement de Tax au niveau des membranes autophagiques, ou si d'autres SLR capables d'interagir avec Tax remplissent également ce rôle. Si la redondance n'est pas totale, il est également possible d'envisager que les modes d'action de p62, OPTN et TAX1BP1 se recoupent. Par exemple, le recrutement par p62 de Tax au niveau de membranes sur lesquelles seraient également recrutés OPTN et TAX1BP1 pourrait augmenter les effets de OPTN et TAX1BP1 sur la signalisation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Les actions de OPTN et TAX1BP1 sur la signalisation NF- κ B par Tax ont été décrites comme coopératives [Journo et al., 2009]. Une coopération des SLR dans le recrutement de Tax au niveau des membranes autophagiques ou dans le recrutement d'autres facteurs impliqués dans la signalisation NF- κ B peut donc également être envisagée.

C. Rôle de la dégradation autophagique dans l'activation de NF- κ B par Tax

De manière plus large, nos travaux mettent en lumière les interactions fonctionnelles entre l'activation de la voie NF- κ B par Tax et les voies de l'autophagie cellulaire. En effet, nous avons montré qu'indépendamment de l'étude des SLR, l'activation complète de la voie NF- κ B médiée par Tax nécessite une machinerie autophagique fonctionnelle. Au cours du travail de thèse, nos données sur cette question ont été confirmées par un autre groupe, montrant l'importance des facteurs ATG5 et BECN1 dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax [Chen et al., 2015]. Cet effet global de l'autophagie sur l'activité de Tax comprend, entre autres, l'effet porté par p62, ainsi que l'effet d'autres SLR sur lesquels nous reviendrons.

Mais au-delà de l'effet sur la signalisation canonique NF- κ B que nous décrivons, nous ne pouvons exclure d'autres effets positifs portés par la voie autophagique sur l'activation de NF- κ B dans le contexte de l'infection par le virus HTLV-1. En effet, la promotion de la formation de

membranes autophagiques décrite pour Tax pourrait promouvoir l'activation de la voie NF- κ B par des effets autophagiques dégradatifs. Comme nous l'avons vu plus haut, l'autophagie est un potentiateur connu de la voie NF- κ B, par la dégradation de facteurs inhibiteurs comme I κ B α par exemple [Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011]. Par ce biais, Tax pourrait également promouvoir l'inhibition de l'apoptose et la survie cellulaire. Il pourrait être possible de déterminer l'existence d'un potentiel rôle de la dégradation autophagique dans les effets de Tax sur NF- κ B à l'aide de cocktails d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale par exemple.

D. Rôle de l'ubiquitination de Tax

Il a été montré que le rôle de l'ubiquitination de Tax est crucial pour l'activation de la voie NF- κ B, et notamment dans la potentialisation de cette voie par OPTN [Journo et al., 2009]. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une possible modulation de l'ubiquitination de Tax par p62. Nos expériences montrent une absence de différence significative entre les conditions cellulaires exprimant ou non p62 concernant le taux global d'ubiquitination de Tax. Cette absence d'effet global ne permet toutefois pas d'évacuer l'hypothèse d'un rôle de l'ubiquitination de Tax dans cet effet de p62. En effet, il est possible d'imaginer que le type d'ubiquitination peut être modulé par la présence de p62. La littérature nous renseigne sur l'importance notamment des chaînes de poly-ubiquitination de type K63 et M1, comme nous l'avons exposé plus haut [Shibata et al., 2011]. Cette possible modulation pourra être étudiée en répétant le même montage expérimental suivi par l'analyse du type d'ubiquitination de Tax, notamment en utilisant des anticorps spécifiques des chaînes de type K63 et M1, ou des expériences de dé-ubiquitination spécifique de certains types de chaînes.

E. Validation de la pertinence physiologique de la potentialisation par p62

Par nos travaux, nous avons donc caractérisé les interactions physiques et fonctionnelles entre Tax et p62, et poussé plus loin la caractérisation des interactions entre Tax et les voies autophagiques. Ces travaux participent à ouvrir des perspectives quant aux interactions entre l'autophagie et la voie NF- κ B, en s'intéressant à la potentielle utilisation des membranes autophagiques comme des plateformes de signalisation. Mais si, comme nous l'avons vu dès le début de ce manuscrit, l'étude des virus en général, et des virus oncogènes en particulier, est d'intérêt pour comprendre la physiologie cellulaire, qu'en est-il des potentiels retours de ce travail sur

la compréhension de la pathologie ATL, causée dans le cadre de l'infection des lymphocytes T par le virus HTLV-1 ?

La première étape est de reproduire ces résultats dans des cellules issues de lignées cellulaires T. Des expériences sont actuellement en cours en utilisant la lignée Jurkat, afin de déterminer si p62 est également porteur d'un effet potentiateur de l'activation de la voie NF- κ B dans ces cellules. Dans cette optique, des stratégies expérimentales proches de celles utilisées pour les cellules HeLa, se basant sur des constructions rapportrices NF- κ B, sont utilisées, ainsi que des approches complémentaires en immunoblots permettant de détecter la dégradation du facteur I κ B α et la phosphorylation des kinases IKK.

Dans un second temps, il convient de rappeler que les événements de transformation cellulaire causés par Tax se situent à des étapes précoces de l'infection des cellules par HTLV-1. Peu de modèles cellulaires permettent de rendre compte de ces étapes de manière satisfaisante, et les cellules chroniquement infectées par HTLV-1 disponibles au laboratoire correspondent à des cellules étant déjà passées par le processus complet de transformation. Dans ce contexte, seules des expériences de transformation *in vitro* ou en utilisant des souris humanisées pourraient permettre de savoir si p62 joue un rôle significatif dans l'oncogenèse causée par HTLV-1. Pour l'heure, ces approches sont rendues complexes par l'absence de caractérisation du domaine d'interaction avec p62 au sein de la séquence de Tax. De plus amples études sont nécessaires pour identifier un mutant de Tax incapable d'interagir avec p62, permettant d'imaginer des expériences utilisant un clone moléculaire de HTLV-1 contenant cette mutation. Une fois ce mutant identifié, il serait envisageable de tester ses propriétés de transformation *in vitro* ou dans d'autres modèles de transformation, comme des souris humanisées injectées avec des cellules infectées par un clone moléculaire portant cette mutation ou encore en évaluant le pouvoir transformant de ce mutant après expression en modèle drosophile [Shirinian et al., 2015]. Ce modèle est particulièrement intéressant car un orthologue de p62 y est décrit, Ref(2)P, seul homologue des SLR avec l'orthologue NEMO, qui possède des fonctions autophagiques et immunitaires conservées [Bartlett et al., 2011]. En absence de cet outil, il faudrait utiliser des modèles exprimant la version p62 Δ MIR, incapable d'interagir avec Tax, avec les biais possibles liés au fait que ce domaine est impliqué dans de nombreuses autres interactions fonctionnelles, pouvant fausser l'interprétation des résultats expérimentaux.

II Caractéristiques de la déplétion de Tax en sur-expression de p62 et en condition d'activation de l'autophagie

En cherchant à aller plus loin dans la caractérisation des interactions fonctionnelles entre p62 et l'activation de la voie NF- κ B par Tax, nous avons mis au jour un effet dual et dépendant de la dose de p62 sur Tax. En effet, dans des conditions de sur-expression de p62, l'activation de NF- κ B par Tax est réprimée et Tax lui-même est la cible d'un phénomène de déplétion cytosolique s'apparentant à une séquestration vésiculaire de manière indépendante des médiateurs de l'autophagie canonique. À la suite de ces résultats, nous avons cherché à caractériser l'impact de l'activation de l'autophagie sur la protéine Tax. Nos résultats montrent la déplétion de Tax lors de l'activation de l'autophagie en conditions de jeûne cellulaire, déplétion qui est indépendante du facteur autophagique canonique ATG7.

En condition de sur-expression de p62, la détection de Tax par immunoblot diminue fortement, et l'activation de la voie NF- κ B est inhibée proportionnellement. Nos expériences utilisant des tampons de lyse ayant des pouvoirs de solubilisation différents, nous avons constaté avec surprise que cette déplétion n'était pas médiée par une dégradation. Sans l'avoir démontré de manière stricte, ces résultats ainsi que ceux obtenus par fractionnement sub-cellulaire convergent vers l'hypothèse d'une séquestration vésiculaire de Tax dans ces conditions. L'hypothèse la plus parcimonieuse est d'imaginer qu'en présence d'une forte dose de p62, Tax est séquestré dans des vésicules autophagiques. Il a été montré que Tax est capable d'inhiber la maturation autophagique, en inhibant la fusion entre autophagosomes et lysosomes [Tang et al., 2013]. Ce phénomène peut être mis en rapport avec nos résultats montrant l'absence de dégradation de Tax en condition de sur-expression de p62.

Nous avons cherché à déterminer si cette déplétion était liée à la machinerie autophagique. L'inhibition de la dégradation lysosomale en utilisant un cocktail E64d / pepstatine montre un sauvetage de la déplétion de Tax en condition de sur-expression de p62. Ce résultat semble suggérer que la déplétion observée est liée à une dégradation de Tax, ce qui est contradictoire avec les autres résultats obtenus. Ce paradoxe est probablement dû à une durée de traitement très longue (22 h), qui pourrait potentiellement modifier le flux autophagique dans des proportions bien supérieures à l'effet recherché, en bloquant le flux autophagique, ce qui pourrait limiter la séquestration. De plus amples investigations sont en cours pour déterminer plus rigoureusement l'effet de la dégradation lysosomale sur cette déplétion, notamment avec des traitements plus

courts avec ce cocktail d'inhibiteurs. La comparaison des effets de ces inhibiteurs pour différentes durées de traitement pourrait donc apporter de précieuses informations sur le mécanisme de déplétion de Tax.

Les expériences en répression génétique de la voie autophagique canonique réalisées par la suite ont montré que cette déplétion est indépendante des facteurs canoniques ATG7, ATG5 et BECN1. Ces résultats ne permettent pas d'apporter une conclusion forte quant au rôle de l'autophagie dans cette déplétion de Tax. Une prise en charge par des voies autophagiques non-canoniques est une hypothèse possible, la description de mécanismes autophagiques non-canoniques étant un sujet émergent dans le domaine [Codogno et al., 2011].

Indépendamment de cette question, ces expériences mises en commun avec la partie précédente de notre étude montrent que p62 porte un rôle dual dans la signalisation de la voie NF- κ B dans le contexte de l'activation par Tax, en jouant un rôle à la fois dans la promotion de la signalisation et dans sa régulation. Ce double effet est à mettre en relation avec celui de p62 décrit dans l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules T, où p62 joue à la fois un rôle de structuration des signalosomes POLKADOTS et de régulation de ces signalosomes, par un phénomène de dégradation autophagique [Paul et al., 2012]. Pour autant, le caractère ATG7-indépendant de la déplétion alors que la potentialisation de la signalisation NF- κ B par p62 est ATG7-dépendant complexifie ce modèle. La question de la nature des membranes impliquées dans chacun de ces deux mécanismes reste donc ouverte, notamment la question de savoir si les mêmes membranes sont responsables de ces deux phénomènes.

Dans ces conditions, la fraction non-nucléaire de Tax est fortement impactée par cette potentielle séquestration, ce qui est à mettre en lien avec l'inhibition spécifique de l'activation de la voie NF- κ B. Il convient toutefois de préciser que si nos résultats ne montrent pas de diminution significative de l'activation du LTR de HTLV-1, une légère diminution progressive de cette activation est visible, ce qui suggère que l'activation du LTR est également influencée par la déplétion de Tax, mais moins fortement. La façon la plus parcimonieuse d'interpréter ce résultat est de considérer que la déplétion cytosolique de Tax se traduit par une diminution de la fraction nucléaire, mais avec une latence due à la navette nucléo-cytoplasmique de Tax. Sans que ce soit le but initial de cette expérience, il est notable de constater une activation significative du LTR de HTLV-1 correspondant à des doses indétectables en immunoblot de Tax, allant dans le sens d'un effet de Tax sur le LTR pour des doses très faibles.

L'étude portant sur l'inhibition du flux autophagique par Tax montre également que cette inhibition de la dégradation autophagique promeut la stabilité de Tax, suggérant fortement une prise en charge autophagique de Tax [Tang et al., 2013]. Nos expériences en condition d'activation de l'autophagie par le jeûne cellulaire montrent la déplétion de Tax dans ces conditions. Les résultats en condition d'activation de l'autophagie sont très similaires à ceux obtenus en condition de sur-expression de p62, jusqu'au caractère indépendant des voies canoniques de l'autophagie. Il est possible que les phénomènes cellulaires en condition de sur-expression de p62 et d'activation de l'autophagie par le jeûne cellulaire soient les mêmes, mais la réalisation d'expériences d'immunoblot en comparant deux tampons de lyse aux pouvoirs de solubilisation différents est nécessaire pour avancer vers une conclusion sur cette question.

A. Pertinence physiologique de la sur-expression de p62

A.1. Sur-expression sous effet de l'activation de NF- κ B

Tous ces phénomènes décrits en condition de sur-expression de p62 ont été obtenus en utilisant des systèmes expérimentaux de transfection. La question de la pertinence physiologique de cette expression de fortes doses de p62 est donc prégnante. Or, des études précédentes ont montré que l'expression de p62 augmente dans les cellules T ainsi que les cellules de la lignée myéloïde activées au LPS [Paul et al., 2014, Zhong et al., 2016]. Ainsi, dans le contexte de l'infection par HTLV-1, l'activation des voies cellulaires, et notamment de la voie NF- κ B, peuvent potentiellement promouvoir l'expression de p62. Cette activation de l'expression de p62 reste cependant à confirmer dans le contexte de la néo-infection par le virus HTLV-1.

A.2. Contexte physiologique possible de la sur-expression de p62 au cours de l'infection par HTLV-1

Si l'activation de l'expression de p62 consécutive à l'infection par HTLV-1 et l'activation de NF- κ B se confirme dans le contexte de l'infection par HTLV-1, deux cas principaux où cette inhibition de Tax par p62 peut se produire apparaissent. Le premier, et le plus important fonctionnellement, est un potentiel rétro-contrôle exercé par p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. En effet, l'expression de p62 augmentant lors de l'activation de NF- κ B, l'inhibition de Tax qui en découle pourrait limiter l'activation de la voie NF- κ B. Cette potentielle boucle de régulation de NF- κ B dans les cellules néo-infectées pourrait être un mécanisme permettant de limiter les effets délétères connus d'une hyper-activation de la voie NF- κ B que nous

avons déjà évoqués [Zhi et al., 2011]. Le second contexte dans lequel cette inhibition pourrait jouer un rôle correspond aux phases d'inhibition de l'expression de Tax. Comme nous l'avons vu en introduction, l'expression de Tax diminue après les phases précoces de l'infection sous l'influence de plusieurs paramètres, dont l'inhibition de la transcription 5' par le facteur HBZ. Or, si l'on considère que cette séquestration se produit lorsque les niveaux d'expression de p62 sont supérieurs à ceux de Tax, cette déplétion pourrait jouer un rôle d'amplification de l'inhibition du niveau protéique de Tax présent dans le cytosol. Les dernières études suggérant une expression cyclique de Tax, avec des phases de ré-expression (les *bursts* d'expression de Tax) rendent ce mécanisme potentiel encore plus important, car il se produirait à de nombreuses reprises au cours de l'infection [Mahgoub et al., 2017].

III Caractère général des interactions fonctionnelles entre Tax et les SLR

A. Interactions entre Tax et OPTN

Au-delà de la caractérisation des interactions fonctionnelles entre Tax et p62, nous avons cherché au cours de notre étude à déterminer si les interactions physiques et fonctionnelles entre Tax et les membres de la famille des SLR sont généralisables. Avant nos travaux montrant un effet dual et dépendant de la dose de p62 sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax, de précédentes études avaient montré l'effet potentiateur de OPTN sur cette même activité [Journo et al., 2009]. Cet effet potentiateur semble être continu, sans montrer d'inhibition pour des fortes doses d'expression d'OPTN, et repose sur un mécanisme de stabilisation de l'ubiquitination de Tax par ce facteur, avec lequel Tax interagit de manière dépendante de l'ubiquitine.

Nos travaux sur OPTN ont montré qu'au moins une part des complexes Tax / OPTN étaient localisés au niveau de membranes autophagiques riches en LC3. La répression génétique du facteur autophagique canonique ATG7 provoque une diminution de l'effet potentiateur porté par OPTN sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax, ce qui suggère que le rôle porté par l'autophagie sur cette signalisation est généralisable à l'effet d'OPTN. Il est possible de formuler l'hypothèse d'un potentiel effet d'échafaudage de signalisation porté par OPTN, qui pourrait ancrer Tax au niveau des membranes autophagiques par l'intermédiaire de son interaction avec LC3. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant l'effet d'un mutant OPTN Δ LIR sur l'ac-

tivation de NF- κ B par Tax.

Tous les SLR étudiés jusqu'ici s'étant révélés être de bons candidats d'interaction fonctionnelle avec Tax, nous avons ébauché de premières expériences pour étudier les deux SLR restants, à savoir NDP52 et NBR1.

B. Premiers éléments sur les autres membres de la famille

B.1. Données préliminaires sur NDP52 et NBR1

Les premières données exposées dans ce manuscrit concernant NDP52 et NBR1 restent très préliminaires. Ne disposant pour l'heure que de peu d'outils pour l'étude des formes endogènes de ces deux facteurs, nous nous sommes limités à des études biochimiques et fonctionnelles en condition de sur-expression de constructions couplées à des étiquettes.

Nos résultats suggèrent l'existence d'une interaction physique à la fois entre Tax et NDP52 ainsi qu'entre Tax et NBR1. La confirmation de ces interactions en conditions endogènes est bien sûr nécessaire, ainsi que la détermination de leur dépendance ou non vis-à-vis de l'ubiquitination de Tax.

Du point de vue fonctionnel, les études utilisant des rapporteurs luciférases NF- κ B montrent que la sur-expression de NBR1 comme de NDP52 a un effet sur l'activation de cette voie par Tax. Il est intéressant de constater que dans les deux cas, on peut observer une courbe en cloche pour l'activation de NF- κ B en fonction de la dose d'expression de chacun de ces deux SLR. L'allure de ces résultats préliminaires suggère que leur comportement est à rapprocher de celui observé pour p62, avec un effet potentiateur à faibles doses suivi par un effet inhibiteur pour des doses plus élevées. Tous ces résultats demandent des études plus approfondies, notamment en utilisant des siARN ciblant NDP52 et NBR1 afin de déterminer l'effet à doses endogènes. La caractérisation de l'effet inhibiteur de ces SLR à fortes doses sera également nécessaire, notamment pour déterminer si ces effets mettent ou non en jeu un déplétion de Tax.

B.2. Existence de caractéristiques générales ?

À l'issue de cette étude, et tout en gardant à l'esprit le caractère préliminaire des données concernant NDP52 et NBR1, il semble que l'interaction avec la protéine Tax soit un caractère général des SLR. Nos connaissances actuelles nous renseignent déjà sur le fait que ces interactions ne sont pas toutes de même nature et ne font pas toutes intervenir les mêmes domaines d'interaction des SLR, OPTN interagissant avec Tax par le biais de son domaine UBAN et p62

par le biais de son domaine MIR. Des différences fonctionnelles apparaissent également, avec OPTN se comportant comme un potentiateur de l'activation de NF- κ B par Tax stabilisant son ubiquitination, là où p62 porte un effet dual sur cette activité de Tax, sans intervenir sur le niveau d'ubiquitination de Tax. Des caractérisations plus poussées nous permettront de déterminer comment se comportent NBR1 et NDP52, et ainsi savoir si ces derniers sont plus proches du mode d'interaction d'OPTN, de p62 ou s'ils constituent des cas à part. Le cas échéant, il serait intéressant de déterminer si ces éventuelles catégories sont superposables aux sous-groupes évolutifs définis précédemment au sein des SLR.

Cette question nous ramène à celle des interactions fonctionnelles entre les SLR et la voie NF- κ B. En effet, comme nous l'avons évoqué en introduction, la plupart des SLR sont décrits dans des interactions fonctionnelles directes ou indirectes avec des médiateurs et régulateurs de la voie NF- κ B. Nos travaux vont dans ce sens, en décrivant un lien entre les SLR et la voie NF- κ B dans le contexte de Tax pour tous les membres aujourd'hui décrits de cette famille. Cette généralisation fonctionnelle ouvre des questions d'ordre évolutif. Nous avons évoqué que la famille des SLR est constituée de sous-groupes évolutifs aux histoires distinctes. Il apparaît manifeste que le caractère autophagique de ces facteurs n'est pas leur unique point commun, et ces données suggèrent un lien évolutif entre les mécanismes autophagiques et la signalisation NF- κ B, lien à mettre en relation avec celui déjà décrit entre les mécanismes immunitaires et prolifératifs.

Ce caractère généralisable soulève une ultime question : celle de l'existence de complexes d'ordre supérieur, impliquant l'interaction de plusieurs SLR à Tax de manière simultanée. Des études très préliminaires d'imagerie que nous n'avons pas intégrées à ce manuscrit montrent que Tax, OPTN et p62 peuvent colocaliser en cellules HeLa. Cela soulève l'hypothèse de l'existence de complexes ternaires Tax / OPTN / p62, rendus conceptuellement possibles par leurs différences de mode d'interaction, OPTN se fixant aux chaînes d'ubiquitine de Tax à l'inverse de p62. Une fois la caractérisation des interactions Tax / NDP52 et Tax / NBR1 terminée, les autres supra-complexes plausibles pourront être étudiés.

CHAPITRE 4

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur les interactions entre Tax et la machinerie autophagique cellulaire, notamment en rapport avec l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'interaction entre Tax et le récepteur autophagique p62, ainsi que l'effet dual de ce facteur sur l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Des données préliminaires suggèrent que Tax interagit également avec les récepteurs autophagiques NDP52 et NBR1, et que ces deux facteurs modulent l'activation de la voie NF- κ B par Tax.

L'étude des voies de signalisation cellulaire a évolué au cours des dernières années, avec notamment l'émergence de la notion d'échafaudage moléculaire, qui cherche à identifier les supports physiques d'ancrage des médiateurs moléculaires impliqués dans les voies de signalisation, appelés plateformes de signalisation. Le rôle des membranes autophagiques comme plateformes de signalisation est une hypothèse émergente dans la littérature que nous avons été amenés à explorer au travers de l'étude des interactions entre Tax et les récepteurs SLR, famille contenant déjà deux partenaires fonctionnels décrits pour Tax.

Nos résultats montrent que p62 potentialise l'activation de la voie NF- κ B par Tax au niveau de complexes Tax / p62 localisés aux membranes autophagiques, suggérant fortement que ces membranes jouent effectivement le rôle de plateformes de signalisation. L'implication des membranes autophagiques a également été démontrée pour l'activité potentialisatrice du facteur OPTN décrit plus tôt. De plus, p62 porte un effet répresseur de cette activation en contexte de forte expression, par un mécanisme de déplétion de Tax qui reste à caractériser finement.

Ainsi, par l'exploitation du modèle d'activation de la voie NF- κ B par Tax, nos travaux participent à approfondir la description des interactions fonctionnelles entre l'autophagie et la voie NF- κ B, en étant l'une des premières à suggérer un échafaudage de signalisation au niveau de ces membranes dans le cadre de cette voie de signalisation, élargissant par la même occasion le spectre des voies de signalisation qui pourraient passer par les membranes autophagiques.

Tout en relativisant l'impact de ces travaux, nous pouvons les inscrire dans une perspective bien plus large conceptuellement, qui consiste à étudier les effets de voies immunitaires, comme ici l'autophagie sélective, dans un contexte de signalisation proliférative. En effet, cette interaction entre Tax et p62 peut être considérée comme un phénomène de détournement d'un processus plutôt anti-viral au bénéfice de la promotion de la prolifération des cellules infectées. En cela, nos résultats sont tout à fait en accord avec une accumulation d'éléments décrivant de nombreux acteurs moléculaires partagés entre les voies de l'autophagie et de la voie de signalisation NF- κ B. Dans un contexte encore plus large, ce chevauchement fonctionnel entre

CHAPITRE 4. CONCLUSION

acteurs immunitaires et prolifératifs apporte un éclairage potentiel aux mécanismes évolutifs aboutissant à l'apparition du phénomène d'oncogenèse virale.

Bibliographie

- [Abràmoff et al., 2004] Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004). Image processing with imageJ. *Biophotonics International* 11, 36–41.
- [Achong et al., 1971] Achong, B. G., Mansell, P. W. and Epstein, M. A. (1971). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *The Journal of pathology* 103, P18.
- [Afonso et al., 2008] Afonso, P. V., Ozden, S., Cumont, M. C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A., Couraud, P. O., Pique, C., Ceccaldi, P. E. and Romero, I. A. (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathogens* 4.
- [Al Rawi et al., 2011] Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R. and Galy, V. (2011). Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission. *Science* 331, 1199–203.
- [Alais et al., 2015] Alais, S., Mahieux, R. and Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *Journal of virology* 89, 10580–10590.
- [Aplin et al., 1992] Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D. L., Lenk, S. E. and Dunn, W. A. (1992). Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *Journal of Cellular Physiology* 152, 458–466.
- [Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006] Appenzeller-Herzog, C. and Hauri, H.-P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) : in search of its identity and function. *Journal of cell science* 119, 2173–2183.
- [Arnold et al., 2006] Arnold, J., Yamamoto, B., Li, M., Phipps, A. J., Younis, I., Lairmore, M. D. and Green, P. L. (2006). Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* 107, 3976–3982.
- [Arnold et al., 2008] Arnold, J., Zimmerman, B., Li, M., Lairmore, M. D. and Green, P. L. (2008). Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112, 1–4.

BIBLIOGRAPHIE

- [Ashford and Porter, 1962] Ashford, T. and Porter, K. (1962). Cytoplasmic Components in Hepatic Cell Lysosomes. *Cell Biol.* *12*, 198–202.
- [Bakhoun et al., 2014] Bakhoun, S. F., Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Nicholson, J. M., Compton, D. A. and Cimini, D. (2014). The mitotic origin of chromosomal instability. *Current Biology* *24*, R148–R149.
- [Balagopalan et al., 2009] Balagopalan, L., Barr, V. A. and Samelson, L. E. (2009). Endocytic events in TCR signaling : Focus on adapters in microclusters. *Immunological Reviews* *232*, 84–98.
- [Baldwin, 2012] Baldwin, A. S. (2012). Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- κ B : Critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunological Reviews* *246*, 327–345.
- [Ballard et al., 1988] Ballard, D. W., Böhnlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, B. R. and Greene, W. C. (1988). HTLV-1 tax induces cellular proteins that activate the kB element in the IL-2 receptor a gene. *Science* *241*, 1652–1655.
- [Banerjee et al., 2008] Banerjee, P., Sieburg, M., Samuelson, E. and Feuer, G. (2008). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection of CD34+ hematopoietic progenitor cells induces cell cycle arrest by modulation of p21(cip1/waf1) and survivin. *Stem Cells* *26*, 3047–3058.
- [Bartlett et al., 2011] Bartlett, B. J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R. W., Cumming, R. C., Harris, G. L., Nezis, I. P., Schubert, D. R., Simonsen, A. and Finley, K. D. (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* *7*, 572–583.
- [Bartman et al., 2008] Bartman, M. T., Kaidarova, Z., Hirschhorn, D., Sacher, R. A., Frisley, J., Gibble, J., Smith, J. W., Newman, B., Yeo, A. E., Murphy, E. L., Garratty, G. and Outcomes, H. (2008). Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. *Blood* *112*, 3995–4002.
- [Basbous et al., 2003] Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C. and Mesnard, J. M. (2003). The HBZ Factor of Human T-cell Leukemia Virus Type I Dimerizes with Transcription Factors JunB and c-Jun and Modulates Their Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 43620–43627.
- [Bazarbachi et al., 2010] Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Ramos, J. C., Tortevoeye, P., Otrrock, 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. *Journal of Clinical Oncology* *28*, 4177–4183.
- [Beale et al., 2014] Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P. and Randow, F. (2014). A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host and Microbe* *15*, 239–247.
- [Beasley et al., 1981] Beasley, R. P., Hwang, L.-Y., Lin, C.-C. and Chien, C.-S. (1981). Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B Virus : A Prospective Study of 22,707 Men in Taiwan. *The Lancet* *2*, 1129–1133.
- [Belgnaoui et al., 2010] 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. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 32897–32905.

- [Bellon et al., 2010] 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.
- [Bellon et al., 2009] Bellon, M., Lepelletier, Y., Hermine, O. and Nicot, C. (2009). Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* *113*, 4914–4917.
- [Beral et al., 1990] Beral, V., Peterman, T., Berkelman, R. and Jaffe, H. (1990). Kaposi's sarcoma among persons with AIDS : a sexually transmitted infection? *Lancet* *335*, 123–128.
- [Bex et al., 1999] 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. *Journal of virology* *73*, 738–745.
- [Bhuin and Roy, 2014] Bhuin, T. and Roy, J. K. (2014). Rab proteins : The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* *328*, 1–19.
- [Bidoia et al., 2010] 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.
- [Bilman et al., 2017] Bilman, M. R., Rueda, D. and Bangham, C. (2017). Quantification of HTLV-1 expression at the single-cell level in naturally infected T lymphocytes. Conférence présentée lors du *18^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine*.
- [Bjørkøy et al., 2005] Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *Journal of Cell Biology* *171*, 603–614.
- [Blumberg et al., 1967] Blumberg, B., Gerstley, B., Hungerford, D., WT, L. and Sutnick, A. (1967). A serum antigen (Australian antigen) in Down's syndrome, leukaemia and hepatitis. *Ann Intern Med* *66*, 924–931.
- [Bonnet et al., 2012] Bonnet, A., Randrianarison-Huetz, V., Nzounza, P., Nedelec, M., Chazal, M., Waast, L., Pene, S., Bazarbachi, A., Mahieux, R., Bénit, L. and Pique, C. (2012). Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF- κ B promoter activation. *Retrovirology* *9*, 77.
- [Borel et al., 2015] Borel, S., Robert-Hebmann, V., Alfaisal, J., Jain, A., Faure, M., Espert, L., Chaloin, L., Paillart, J.-c., Johansen, T. and Biard-piechaczyk, M. (2015). HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* *29*, 275–286.
- [Bours et al., 1992] Bours, V., Burd, P. R., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R. P., Bravo, R., Kelly, K. and Siebenlist, U. (1992). A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF- κ B participates in transactivation through a κ B site. *Molecular and cellular biology* *12*, 685–95.
- [Boxus et al., 2008] Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R. and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* *5*, 76.
- [Burkitt, 1962] Burkitt, D. (1962). A Tumour Syndrome Affecting Children in Tropical Africa. *Post-graduate medical journal* *38*, 71–79.

BIBLIOGRAPHIE

- [Cachat et al., 2014] Cachat, A., Alais, S., Chevalier, S. A., Journo, C., Fusil, F., Dutartre, H., Boniface, A., Ko, N. L., Gessain, A., Cosset, F.-L., Suspène, R., Vartanian, J.-P. and Mahieux, R. (2014). ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology* *11*, 1–15.
- [Cachat et al., 2013] Cachat, A., Chevalier, S. A., Alais, S., Ko, N. L., Ratner, L., Journo, C., Dutartre, H. and Mahieux, R. (2013). α interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *Journal of virology* *87*, 13386–96.
- [Calattini et al., 2005] 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.
- [Cao et al., 2014] Cao, S., Maldonado, J. O., Grigsby, I. F., Mansky, L. M. and Zhang, W. (2014). Analysis of human T-cell leukemia virus type 1 particles by using cryo-electron tomography. *Journal of virology* *89*, 2430–5.
- [Caron et al., 1993] Caron, C., Rousset, R., Beraud, 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.
- [Chandhasin et al., 2008] Chandhasin, C., Ducu, R. I., Berkovich, E., Kastan, M. B. and Marriott, S. J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *Journal of virology* *82*, 6952–61.
- [Chang et al., 1994] Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. and Moore, P. S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* *266*, 1865–1869.
- [Chaurushiya and Weitzman, 2009] Chaurushiya, M. S. and Weitzman, M. D. (2009). Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. *DNA Repair* *8*, 1166–1176.
- [Chen et al., 2015] Chen, L., Liu, D., Zhang, Y., Zhang, H. and Cheng, H. (2015). The autophagy molecule Beclin 1 maintains persistent activity of NF- κ B and Stat3 in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *465*, 739–745.
- [Cheng et al., 2012] Cheng, H., Ren, T. and cong Sun, S. (2012). New insight into the oncogenic mechanism of the retroviral oncoprotein Tax. *Protein and Cell* *3*, 581–589.
- [Chevalier et al., 2014] Chevalier, S. A., Turpin, J., Cachat, A., Afonso, P. V., Gessain, A., Brady, J. N., Pise-Masison, C. A. and Mahieux, R. (2014). Gem-Induced Cytoskeleton Remodeling Increases Cellular Migration of HTLV-1-Infected Cells, Formation of Infected-to-Target T-Cell Conjugates and Viral Transmission. *PLoS Pathogens* *10*, 1–19.
- [Chiang and Dice, 1988] Chiang, H. L. and Dice, J. F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *Journal of Biological Chemistry* *263*, 6797–6805.
- [Chiari et al., 2004] Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Bex, F. and Pique, C. (2004). Stable Ubiquitination of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *Journal of virology* *78*, 11823–11832.
- [Ching et al., 2006] 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. *Nature Cell Biology* *8*, 717–724.

- [Chipuk and Green, 2006] Chipuk, J. E. and Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death and Differentiation* *13*, 994–1002.
- [Chlichlia and Khazaie, 2010] Chlichlia, K. and Khazaie, K. (2010). HTLV-1 Tax : Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chemico-Biological Interactions* *188*, 359–365.
- [Cho et al., 2007] 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. *The Journal of Virology* *81*, 11179–11186.
- [Choi and Harhaj, 2014] Choi, Y. B. and Harhaj, E. W. (2014). HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation. *PLoS Pathogens* *10*, e1004458.
- [Choo et al., 1989] Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L. R., Bradley, D. and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA Clone Derives from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* *244*, 359–362.
- [Ciuffa et al., 2015] Ciuffa, R., Lamark, T., Tarafder, A. K., Guesdon, A., Rybina, S., Hagen, W. J. H., Johansen, T. and Sachse, C. (2015). The Selective Autophagy Receptor p62 Forms a Flexible Filamentous Helical Scaffold. *Cell Reports* *11*, 748–758.
- [Clark, 1957] Clark, S. L. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* *3*, 349–362.
- [Clausen et al., 2010] Clausen, T. H., Lamark, T., Isakson, P., Finley, K., Larsen, K. B., Brech, A., Øvervatn, A., Stenmark, H., Bjørkøy, G., Simonsen, A. and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* *6*, 330–344.
- [Clerc et al., 2008] Clerc, I., Polakowski, N., André-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J. M. and Lemasson, I. (2008). An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 23903–23913.
- [Codogno et al., 2011] Codogno, P., Mehrpour, M. and Proikas-Cezanne, T. (2011). Canonical and non-canonical autophagy : variations on a common theme of self-eating ? *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 7–12.
- [Colisson et al., 2010] Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y. and Herbeuval, J. P. (2010). Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *115*, 2177–2185.
- [Colleran et al., 2011] Colleran, A., Ryan, A., O’Gorman, A., Mureau, C., Liptrot, C., Dockery, P., Fearnhead, H. and Egan, L. J. (2011). Autophagosomal I κ B α degradation plays a role in the long term control of tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 22886–22893.
- [Colombo et al., 1989] Colombo, M., Choo, Q., Ninno, E. D., Dioguardi, N., Kuo, G., Donato, M., Tommasini, M. and Houghton, M. (1989). Prevalence of Antibodies to Hepatitis C Virus in Italian Patients with Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet* *334*, 1006 – 1008.

BIBLIOGRAPHIE

- [Cook et al., 2014] Cook, L. B. M., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G. P., Matsuoka, M. and Bangham, C. R. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *123*, 3925–3932.
- [Copetti et al., 2009] Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F. and Schneider, C. (2009). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and cellular biology* *29*, 2594–2608.
- [Cordier et al., 2009] Cordier, F., Grubisha, O., Traincard, F., Véron, M., Delepierre, M. and Agou, F. (2009). The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 2902–2907.
- [Coskun and Sutton, 2005] Coskun, A. K. and Sutton, R. E. (2005). Expression of Glucose Transporter 1 Confers Susceptibility to Human T-Cell Leukemia Virus Envelope-Mediated Fusion. *Journal of Virology* *79*, 4150–4158.
- [Criollo et al., 2012] Criollo, A., Chereau, F., Malik, S. A., Niso-Santano, M., Mariño, G., Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Baud, V. and Kroemer, G. (2012). Autophagy is required for the activation of NF κ B. *Cell Cycle* *11*, 194–199.
- [Criollo et al., 2011] Criollo, A., Niso-Santano, M., Malik, S. A., Michaud, M., Morselli, E., Marino, G., Lachkar, S., Arkhipenko, A. V., Harper, F., Pierron, G., Rain, J. C., Ninomiya-Tsuji, J., Fuentes, J. M., Lavandero, S., Galluzzi, L., Maiuri, M. C. and Kroemer, G. (2011). Inhibition of autophagy by TAB2 and TAB3. *Embo J* *30*, 4908–4920.
- [Criollo et al., 2010] Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M. C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., Tailler, M., Delahaye, N., Tesniere, A., De Stefano, D., Younes, A. B., Harper, F., Pierron, G., Lavandero, S., Zitvogel, L., Israel, A., Baud, V. and Kroemer, G. (2010). IKK connects autophagy to major stress pathways. *Autophagy* *6*, 189–191.
- [Criollo et al., 2009] Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H. E. L. E. N., Maiuri, M. C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., Tailler, M., Delahaye, N., Tesniere, A., De Stefano, D., Ben Younes, A. E. N., Harper, F., Pierron, G. E. R., Lavandero, S., Zitvogel, L., Israel, A., Baud, V. E. R. and Kroemer, G. (2009). The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *The EMBO journal* *29*, 619–631.
- [Da Costa et al., 2016] Da Costa, R. M. G., Bastos, M. M. S. M., Medeiros, R. and Oliveira, P. A. (2016). The NF κ B signaling pathway in papillomavirus-induced lesions : Friend or foe ? *Anticancer Research* *36*, 2073–2083.
- [Danielsen et al., 2015] Danielsen, H. E., Pradhan, M. and Novelli, M. (2015). Revisiting tumour aneuploidy - the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nature reviews. Clinical oncology* *13*, 1–14.
- [Dassouki et al., 2015] Dassouki, Z., Sahin, U., Hajj, H. E., Jollivet, F., Kfoury, Y., Hermine, O., Th, H. D. and Bazarbachi, A. (2015). ATL response to arsenic / interferon therapy is triggered by SUMO / PML / RNF4-dependent Tax degradation. *Blood* *125*, 474–483.
- [de Castro-Amarante et al., 2016] de Castro-Amarante, M., Pise-Masison, C., McKinnon, K., Washington Parks, R., Galli, V., Omsland, M., Andresen, V., Massoud, R., Brunetto, G., Caruso, B., Venzon, D., Jacobson, S. and Franchini, G. (2016). Human T Cell Leukemia Virus Type 1 In-

- fection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. *Journal of virology* *90*, 2195–2207.
- [de Duve, 1963] de Duve, C. (1963). The Lysosome. *Scientific American* *208*, 64–73.
- [De Duve, Christian and Wattiaux, 1966] De Duve, Christian and Wattiaux, R. (1966). Functions of Lysosomes. *Annual review of physiology* *28*, 435–492.
- [De Las Heras et al., 2000] De Las Heras, M., Barsky, S. H., Hasleton, P., Wagner, M., Larson, E., Egan, J., Ortin, A., Gimenez-Mas, J. A., Palmarini, M. and Sharp, J. M. (2000). Evidence for a protein related immunologically to the jaagsiekte sheep retrovirus in some human lung tumours. *European Respiratory Journal* *15*, 330–332.
- [Deosaran et al., 2013] Deosaran, E., Larsen, K. B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., Brech, A., Johansen, T. and Kim, P. K. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *Journal of Cell Science* *126*, 939–52.
- [Der, 1987] Der, C. J. (1987). Cellular oncogenes and human carcinogenesis. *Clinical Chemistry* *33*, 641–646.
- [Dewan et al., 2003] Dewan, M. Z., Terashima, K., Taruishi, M., Hasegawa, H., Ito, M., Tanaka, Y., Mori, N., Sata, T., Koyanagi, Y., Maeda, M., Kubuki, Y., Okayama, A., Fujii, M. and Yamamoto, N. (2003). Rapid Tumor Formation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cell Lines in Novel NOD-SCID / γ Cnull Mice : Suppression by an Inhibitor against NF- κ B. *Journal of virology* *77*, 5286–5294.
- [Di Bartolomeo et al., 2010] Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D’Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F. and Fimia, G. M. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology* *191*, 155–168.
- [Diani et al., 2015] Diani, E., Avesani, F., Bergamo, E., Cremonese, G., Bertazzoni, U. and Romanello, M. G. (2015). HTLV-1 Tax protein recruitment into IKKepsilon and TBK1 kinase complexes enhances IFN-I expression. *Virology* *476*, 92–99.
- [Dice et al., 1978] Dice, J. F., Walker, C. D., Byrne, B. and Cardiel, A. (1978). General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *PNAS* *75*, 2093–7.
- [Diner et al., 2015] Diner, B. A., Lum, K. K. and Cristea, I. M. (2015). The emerging role of nuclear viral DNA sensors. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 26412–26421.
- [Ding et al., 2003] Ding, W., Kim, S.-J., Nair, A. M., Michael, B., Boris-Lawrie, K., Tripp, A., Feuer, G. and Lairmore, M. D. (2003). Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I enhances interleukin-2 production during T-cell activation. *Journal of virology* *77*, 11027–39.
- [Djavaheri-Mergny et al., 2007] Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besançon, F., Bauvy, C. and Codogno, P. (2007). Regulation of Autophagy by NF κ B Transcription Factor and Reactives Oxygen Species. *Autophagy* *3*, 390–392.
- [Djavaheri-Mergny et al., 2006] Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besançon, F., Bauvy, C., Souquère, S., Pierron, G. and Codogno, P. (2006). NF- κ B activation represses tumor necrosis factor- α -induced autophagy. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 30373–30382.
- [Dubouloz et al., 2005] Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E. and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular Cell* *19*, 15–26.

BIBLIOGRAPHIE

- [Ducu et al., 2011] Ducu, R. I., Dayaram, T. and Marriott, S. J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* *416*, 1–8.
- [Dunn, 1994] Dunn, W. A. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in Cell Biology* *4*, 139–143.
- [Easley et al., 2010] 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. *Journal of virology* *84*, 4755–4768.
- [Einsiedel et al., 2016] Einsiedel, L., Woodman, R. J., Flynn, M., Wilson, K., Cassar, O. and Gessain, A. (2016). Human T-Lymphotropic Virus type 1 infection in an Indigenous Australian population : epidemiological insights from a hospital-based cohort study. *BMC Public Health* *16*, 1–11.
- [Epstein et al., 1964] Epstein, M. A., Achong, B. G. and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt'S Lymphoma. *Lancet* *28*, 702–703.
- [Espert et al., 2006] Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P. and Biard-Piechaczyk, M. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *Journal of Clinical Investigation* *116*, 2161–2172.
- [Feng et al., 2008] Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. and Moore, P. S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* *319*, 1092–110.
- [Feng et al., 2007] Feng, H., Taylor, J. L., Benos, P. V., Newton, R., Waddell, K., Lucas, S. B., Chang, Y. and Moore, P. S. (2007). Human Transcriptome Subtraction by Using Short Sequence Tags To Search for Tumor Viruses in Conjunctival Carcinoma.pdf. *Journal of Virology* *81*, 11332–11340.
- [Feng et al., 2003] Feng, X., Heyden, N. V. and Ratner, L. (2003). α interferon inhibits human T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts. *Journal of virology* *77*, 13389–95.
- [Feng and Longmore, 2005] Feng, Y. and Longmore, G. D. (2005). The LIM Protein Ajuba Influences Interleukin-1-Induced NF- κ B Activation by Affecting the Assembly and Activity of the Protein Kinase C / p62 / TRAF6 Signaling Complex. *Molecular and cellular biology* *25*, 4010–4022.
- [Fimia et al., 2007] Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K. and Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* *447*, 1121–1125.
- [Fontan et al., 2007] Fontan, E., Traincard, F., Levy, S. G., Yamaoka, S., Véron, M. and Agou, F. (2007). NEMO oligomerization in the dynamic assembly of the I κ B kinase core complex. *FEBS Journal* *274*, 2540–2551.
- [Fraedrich et al., 2005] Fraedrich, K., Müller, B. and Grassmann, R. (2005). The HTLV-1 Tax protein binding domain of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) includes the regulatory PSTAIRE helix. *Retrovirology* *2*, 54.
- [Fu et al., 2011] Fu, J., Qu, Z., Yan, P., Ishikawa, C., Aqeilan, R., Rabson, A. 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.
- [Fukumoto et al., 2009] Fukumoto, R., Andresen, V., Bialuk, I., Cecchinato, V., Walser, J. C., Valeri, V. W., Nauroth, J. M., Gessain, A., Nicot, C. and Franchini, G. (2009). In vivo genetic mutations

- define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. *Blood* *113*, 3726–3734.
- [Funami et al., 2016] Funami, K., Matsumoto, M., Obuse, C. and Seya, T. (2016). 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. *Molecular Immunology* *73*, 60–68.
- [Funderburk et al., 2010] Funderburk, S. F., Wang, Q. J. and Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology* *20*, 355–362.
- [Furukawa et al., 2001] Furukawa, Y., Kubota, R., Tara, M., Izumo, S. and Osame, M. (2001). Existence of escape mutant in HTLV-1 tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* *97*, 987–993.
- [Ganley et al., 2009] Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S. and Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 12297–12305.
- [Gannagé et al., 2009] Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., García-Sastre, A. and Münz, C. (2009). Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host and Microbe* *6*, 367–380.
- [Gao et al., 2010] Gao, C., Cao, W., Bao, L., Zuo, W., Xie, G., Cai, T., Fu, W., Zhang, J., Wu, W., Zhang, X. and Chen, Y.-G. (2010). Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nature cell biology* *12*, 781–90.
- [Gaudray et al., 2002] 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. *Journal of virology* *76*, 12813–22.
- [Ge et al., 2013] Ge, L., Melville, D., Zhang, M. and Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife* *2*, e00947.
- [Ge et al., 2015] Ge, L., Wilz, L. and Schekman, R. (2015). Biogenesis of autophagosomal precursors for LC3 lipidation from the ER-Golgi intermediate compartment. *Autophagy* *11*, 2372–2374.
- [Geleziunas et al., 1998] Geleziunas, R., Ferrell, S., Lin, X., Mu, Y., Cunningham Jr., 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.
- [Gessain and Cassar, 2012] Gessain, A. and Cassar, O. (2012). Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology* *3*, 388.
- [Gessain et al., 1992] 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. *Journal of Virology* *66*, 2288–2295.
- [Gessain et al., 1985] Gessain, A., Vernant, J. C., Maurs, L., Barin, F., Gout, O., Calender, A. and De Thé, G. (1985). Antibodies To Human T-Lymphotropic Virus Type-I in Patients With Tropical Spastic Paraparesis. *The Lancet* *326*, 407–410.

BIBLIOGRAPHIE

- [Ghez et al., 2006] Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P. M., Heveker, N., Pique, C. and Hermine, O. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of virology* *80*, 6844–6854.
- [Ghosh et al., 1998] Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and Rel Proteins : Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual review of immunology* *16*, 225–260.
- [Giam and Xu, 1989] Giam, C.-Z. and Xu, Y.-L. (1989). HTLV-1 tax gene product activates transcription via preexisting cellular factors and cAMP response element. *Journal of Biological Chemistry* *264*, 15236–15241.
- [Gohda et al., 2007] Gohda, J., Irisawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ohtani, K., Ichi Fujisawa, J. and Ichiro Inoue, J. (2007). HTLV-1 Tax-induced NF κ B activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *357*, 225–230.
- [Good et al., 1997] Good, L., Maggirwar, S. B., Harhaj, E. W. and Sun, S.-C. (1997). Constitutive dephosphorylation and activation of a member of the nuclear factor of activated T cells, NF-AT1, in tax expressing and type I human T-cell leukemia virus-infected human T cells. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 1425–1428.
- [Gordon and Seglen, 1988] Gordon, P. B. and Seglen, P. O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *151*, 40–47.
- [Goubau et al., 1994] 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*). *PNAS* *91*, 2848–2852.
- [Gout et al., 1990] Gout, O., Baulac, M., Gessain, A., Semah, F., Saal, F., Périès, J., Cabrol, C., Foucault-Fretz, C., Laplane, D., Sigauw, F. and De Thé, G. (1990). Rapid Development of Myelopathy after HTLV-I Infection Acquired by Transfusion during Cardiac Transplantation. *N Engl J Med* *322*, 383–8.
- [Granato et al., 2014] Granato, M., Santarelli, R., Farina, A., Gonnella, R., Lotti, L. V., Faggioni, A. and Cirone, M. (2014). Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. *Journal of virology* *88*, 12715–26.
- [Grassmann et al., 1992] 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. *Journal of Virology* *66*, 4570–4575.
- [Gupta et al., 2007] Gupta, S. K., Guo, X., Durkin, S. S., Fryrear, K. F., Ward, M. D. and Semmes, O. J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein prevents DNA damage-induced chromatin egress of hyperphosphorylated Chk2. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 29431–29440.
- [Gwinn et al., 2008] Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* *30*, 214–226.
- [Hagemann and Blank, 2001] Hagemann, C. and Blank, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cellular Signalling* *13*, 863–875.

- [Haller et al., 2002] 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. *Molecular and cellular biology* *22*, 3327–3338.
- [Hanon et al., 2000] 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.
- [Hara et al., 2008] Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S. I., Natsume, T., Guan, J. L. and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* *181*, 497–510.
- [Harhaj et al., 2007] Harhaj, N. S., Sun, S.-c. and Harhaj, E. W. (2007). 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. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 4185–4192.
- [Harrod et al., 1998] 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. *Molecular and cellular biology* *18*, 5052–5061.
- [Hasegawa et al., 2006] Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M. J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K. and Hall, W. W. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nature medicine* *12*, 466–472.
- [Hatta et al., 1995] Hatta, Y., Hirama, T., Miller, C. W., Yamada, Y., Tomonaga, M. and Koeffler, H. P. (1995). Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood* *85*, 2699–704.
- [Hayden and Ghosh, 2014] Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology* *26*, 253–266.
- [Hayward et al., 1981] Hayward, W. S., Neel, B. G. and Astrin, S. M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* *290*, 475–480.
- [Hieshima et al., 2008] 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. *Journal of immunology* *180*, 931–939.
- [Higuchi and Fujii, 2009] 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 et al., 2007] 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- κ B2/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. *Journal of virology* *81*, 11900–7.
- [Hirata et al., 2004] 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

BIBLIOGRAPHIE

- virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* *318*, 327–336.
- [Hironaka et al., 2004] Hironaka, N., Mochida, K., Mori, N., Maeda, M., Yamamoto, N. and Yamaoka, S. (2004). Tax-Independent Constitutive I κ B Kinase Activation in Adult T-Cell Leukemia Cells. *Neoplasia* *6*, 266–278.
- [Hishizawa et al., 2004] Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N. and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon- α -producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *British Journal of Haematology* *125*, 568–575.
- [Ho et al., 2015] Ho, Y. K., Zhi, H., Bowlin, T., Dorjbal, B., Philip, S., Zahoor, M. A., Shih, H. M., Semmes, O. J., Schaefer, B., Glover, J. N. M. and Giam, C. Z. (2015). HTLV-1 Tax Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation. *PLoS Pathogens* *11*, e1005102.
- [Hocking et al., 2002] Hocking, L. J., Lucas, G. J., Daroszewska, A., Mangion, J., Olavesen, M., Cundy, T., Nicholson, G. C., Ward, L., Bennett, S. T., Wuyts, W., Hul, W. V. and Ralston, S. H. (2002). Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget’s disease. *Human Molecular Genetics* *11*, 2735–2739.
- [Hosokawa et al., 2009] Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S. I., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J. L., Oshiro, N. and Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell* *20*, 1981–1991.
- [Hsu et al., 1996] Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. and Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* *4*, 387–396.
- [Huang et al., 2009] 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. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 6208–6217.
- [Ichimura et al., 2000] Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
- [Igakura et al., 2003] Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M. and Bangham, C. R. M. (2003). Spread of HTLV-1 Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science* *299*, 1713–1716.
- [Ikezoe et al., 2007] 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. *Leukemia Research* *31*, 673–682.
- [Ishikawa et al., 2015] Ishikawa, C., Senba, M., Barnes, B. J. and Mori, N. (2015). Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T cells. *International Journal of Oncology* *47*, 361–369.
- [Ishioka et al., 2006] Ishioka, K., Higuchi, M., Takahashi, M., Yoshida, S., Oie, M., Tanaka, Y., Takahashi, S., Xie, L., Green, P. L. and Fujii, M. (2006). Inactivation of tumor suppressor Dlg1 augments

- transformation of a T-cell line induced by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Retrovirology* *3*, 71.
- [Itakura et al., 2008] Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 5360–5372.
- [Itakura et al., 2012] Itakura, E., Kishi-Itakura, C. and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* *151*, 1256–1269.
- [Itakura and Mizushima, 2011] Itakura, E. and Mizushima, N. (2011). p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of cell biology* *192*, 17–27.
- [Iwanaga et al., 2001] Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T. and Nakamura, M. (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* *20*, 2055–2067.
- [Iwanaga et al., 2008] Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M. A., Okamura, N., Huang, Y. and Ohtani, K. (2008). Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF- κ B is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* *27*, 5635–42.
- [Iyama and Wilson, 2013] Iyama, T. and Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* *12*, 620–636.
- [Jacobelli et al., 2004] Jacobelli, J., Andres, P. G., Boisvert, J. and Krummel, M. F. (2004). New views of the immunological synapse : Variations in assembly and function. *Current Opinion in Immunology* *16*, 345–352.
- [Jacobson et al., 1990] Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D., Fauci, A. and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-1 pX in patients with HTLV-1 associated neurological disease.
- [Jeang et al., 1990] Jeang, K., Widen, S., Semmes, O. and Wilson, S. (1990). HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human β -polymerase gene. *Science* *247*, 1082–1084.
- [Jefferies et al., 2001] Jefferies, C., Bowie, A., Brady, G., Cooke, E.-l., Li, X. and Neill, L. a. J. O. (2001). Transactivation by the p65 Subunit of NF- κ B in Response to Kinase 1, TRAF-6 , and Rac1. *Molecular & Cellular Biology* *21*, 4544–4552.
- [Jeffery et al., 2000] Jeffery, K. J. M., Siddiqui, A. A., Bunce, M., Lloyd, A. L., Vine, A. M., Witkover, A. D., Izumo, S., Usuku, K., Welsh, K. I., Osame, M. and Bangham, C. R. M. (2000). The Influence of HLA Class I Alleles and Heterozygosity on the Outcome of Human T Cell Lymphotropic Virus Type I Infection. *The Journal of Immunology* *165*, 7278–7284.
- [Jeong et al., 2005] Jeong, S.-J., Pise-Masison, C. a., Radonovich, M. F., Park, H. U. and Brady, J. N. (2005). Activated AKT regulates NF- κ B activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* *24*, 6719–28.
- [Jin et al., 1998] 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.
- [Jo et al., 2013] Jo, E. K., Yuk, J. M., Shin, D. M. and Sasakawa, C. (2013). Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in Immunology* *4*, 97.

BIBLIOGRAPHIE

- [Johansen and Lamark, 2011] Johansen, T. and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- [Johansen and Lamark, 2014] Johansen, T. and Lamark, T. (2014). Selective autophagy goes exclusive. *Nature cell biology* 16, 395–397.
- [Johnson et al., 2001] 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. *Journal of virology* 75, 6086–6094.
- [Jones et al., 2005] 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. *Journal of Virology* 79, 12692–12702.
- [Jones et al., 2008] 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. *Nature medicine* 14, 429–436.
- [Journo et al., 2009] Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S. A., Afonso, P. V., Brady, J. N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P. O., Mahieux, R. and Weil, R. (2009). NRP/optineurin cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- κ B by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathogens* 5, e1000521.
- [Judith et al., 2013] Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P.-O., Couderc, T. and Lecuit, M. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO reports* 14, 534–44.
- [Jung et al., 2009] Jung, C. H., Bong Jun, C., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell* 20, 1992–2003.
- [Jung et al., 2010] Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M. and Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* 584, 1287–1295.
- [Kalyanaraman et al., 1982] Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Blayney, D., Golde, D. and Gallo, R. C. (1982). A New Subtype of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) Associated with a T-Cell Variant of Hairy Cell Leukemia. *Science* 218, 571–573.
- [Kanayama et al., 2015] Kanayama, M., Inoue, M., Danzaki, K., Hammer, G., He, Y.-w. and Shinohara, M. L. (2015). Autophagy enhances NF κ B activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. *Nature Communications* 6, 1–14.
- [Kannagi et al., 2011] Kannagi, M., Hasegawa, A., Kinpara, S., Shimizu, Y., Takamori, A. and Utsunomiya, A. (2011). Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 by innate and acquired immunity. *Cancer Science* 102, 670–676.
- [Kannagi et al., 2012] Kannagi, M., Hasegawa, A., Takamori, A., Kinpara, S. and Utsunomiya, A. (2012). The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Frontiers in Microbiology* 3, 1–10.
- [Kao and Marriott, 1999] Kao, S. Y. and Marriott, S. J. (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Journal of virology* 73, 4299–304.

- [Karin and Ben-neriah, 2000] Karin, M. and Ben-neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination : The Control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology* 18, 621–663.
- [Karin and Delhase, 2000] Karin, M. and Delhase, M. (2000). The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B : key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in immunology* 12, 85–98.
- [Kataoka et al., 2015] Kataoka et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nature genetics* 47, 1304–15.
- [Kawatsuki et al., 2016] Kawatsuki, A., Yasunaga, J. I., Mitobe, Y., Green, P. L. and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4(+) T cells. *Oncogene* 35, 4509–4517.
- [Kehn et al., 2004] Kehn, K., Deng, L., de la Fuente, C., Strouss, K., Wu, K., Maddukuri, A., Baylor, S., Rufner, R., Pumfery, A., Bottazzi, M. E. and Kashanchi, F. (2004). The role of cyclin D2 and p21/waf1 in human T-cell leukemia virus type 1 infected cells. *Retrovirology* 1, 6.
- [Kfoury et al., 2008] Kfoury, Y., Nasr, R., Favre-Bonvin, a., El-Sabban, M., Renault, N., Giron, M.-L., Setterblad, N., Hajj, H. E., Chiari, E., Mikati, a. G., Hermine, O., Saib, a., de Thé, H., Pique, C. and Bazarbachi, a. (2008). Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27, 1665–1676.
- [Kfoury et al., 2012] Kfoury, Y., Nasr, R., Journon, C., Mahieux, R., Pique, C. and Bazarbachi, A. (2012). The Multifaceted Oncoprotein Tax. Subcellular Localization, Posttranslational Modifications, and NF- κ B Activation. *Advances in Cancer Research* 113, 85–120.
- [Kfoury et al., 2011] Kfoury, Y., Setterblad, N., El-Sabban, M., Zamborlini, A., Dassouki, Z., El Hajj, H., Hermine, O., Pique, C., De Thé, H., Saïb, A. and 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.
- [Kihara et al., 2001] Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 153, 519–530.
- [Kim et al., 2011] Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132–41.
- [Kim et al., 2008] Kim, P. K., Hailey, D. W., Mullen, R. T. and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *PNAS* 105, 20567–74.
- [Kim et al., 2003] Kim, S.-j., Ding, W., Albrecht, B., Green, P. L. and Lairmore, M. D. (2003). A conserved calcineurin-binding motif in human T lymphotropic virus type 1 p12I functions to modulate nuclear factor of activated T cell activation. *The Journal of biological chemistry* 278, 15550–7.
- [Kinjo et al., 2010] 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. *Journal of virology* 84, 5431–7.
- [Kinosada et al., 2017] Kinosada, H., Yasunaga, J.-i., Shimura, K., Miyazato, P., Onishi, C., Iyoda, T., Inaba, K. and Matsuoka, M. (2017). HTLV-1 bZIP Factor Enhances T-cell Proliferation by Impeding the Suppressive Signaling of Co-inhibitory Receptors. *PLoS pathogens* 13, 1–24.
- [Kirk et al., 2016] Kirk, P. D. W., Huvet, M., Melamed, A., Maertens, G. N. and Charles, R. (2016). Retroviruses integrate into a shared , non-palindromic motif. *Nature Microbiology* 14, 1–11.

BIBLIOGRAPHIE

- [Kirkin et al., 2009a] Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J. P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I. and Johansen, T. (2009a). A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell* *33*, 505–516.
- [Kirkin et al., 2009b] Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. and Dikic, I. (2009b). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* *34*, 259–269.
- [Kiššová et al., 2007] Kiššová, I., Salin, B., Schaeffer, J., Manon, S. and Camougrand, N. (2007). Selective and Non-Selective Autophagic Degradation of Mitochondria in Yeast. *Autophagy* *8627*, 329–336.
- [Kiyokawa et al., 1985] Kiyokawa, T., Kawaguchi, T., Seiki, M. and Yoshida, M. (1985). Association of the pX Gene Product of Human T-Cell Leukemia Virus Type-I with Nucleus. *Virology* *465*, 462–465.
- [Klionsky, 2014] Klionsky, D. J. (2014). Citing recent declines in the discovery of new ATG genes, some scientists now suggest that the end of autophagy research may be within sight. *Autophagy* *10*, 715–716.
- [Klionsky, D. et al., 2015] Klionsky, D. et al. (2015). Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.
- [Köchrl et al., 2006] Köchrl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y. W. and Tooze, S. A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* *7*, 129–145.
- [Koiwa et al., 2002] Koiwa, T., Hamano-Usami, A., Ishida, T., Okayama, A., Yamaguchi, K., Kamihira, S. and Watanabe, T. (2002). 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *Journal of virology* *76*, 9389–97.
- [Kovalenko and Chable-bessia, 2003] Kovalenko and Chable-bessia (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NFκB signalling by deubiquitination. *Nature* *424*, 801–805.
- [Kraft et al., 2010] Kraft, C., Peter, M. and Hofmann, K. (2010). Selective autophagy : ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature cell biology* *12*, 836–841.
- [Kroemer et al., 2010] Kroemer, G., Mariño, G. and Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell* *40*, 280–293.
- [Kyei et al., 2009] Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I. and Deretic, V. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *Journal of Cell Biology* *186*, 255–268.
- [Lamb et al., 2013] Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S. A. (2013). The autophagosome : origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*, 759–774.
- [Lambert et al., 2009] Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F. W., Perret, G., Jones, K. S. and Pique, C. (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* *113*, 5176–5185.
- [Lamsoul et al., 2005] Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Burny, A., Gaynor, R. B. and Brasseur, R. (2005). Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF-κB

- Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Molecular and cellular biology* 25, 10391–10406.
- [Larocca et al., 1989] 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 163, 1006–1013.
- [Layfield and Hocking, 2004] Layfield, R. and Hocking, L. J. (2004). SQSTM1 and Paget’s disease of bone. *Calcified Tissue International* 75, 347–357.
- [Lazarou et al., 2015] Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I. and Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–14.
- [LeBreton et al., 2014] LeBreton, M., Switzer, W. M., Djoko, C. F., Gillis, A., Jia, H., Sturgeon, M. M., Shankar, A., Zheng, H., Nkeunen, G., Tamoufe, U., Nana, A., Le Doux Dikko, J., Tafon, B., Kiyang, J., Schneider, B. S., Burke, D. S. and Wolfe, N. D. (2014). A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4. *Emerging microbes & infections* 3, e7.
- [Lee et al., 2005] Lee, K.-y., Acquisto, F. D. and Hayden, M. S. (2005). PDK1 Nucleates T Cell Receptor – Induced Signaling Complex for NF- κ B Activation. *Science* 308, 114–118.
- [Lehky et al., 1995] Lehky, T. J., Levin, M. C., Flerlage, N., Jacobson, S., Fox, C. H., Koenig, S., Izumo, S., Sato, E., Osame, M. and Raine, C. 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. *Annals of Neurology* 37, 167–175.
- [Lemasson et al., 1998] Lemasson, I., The, S., Sardet, C., Devaux, C. and Mesnard, J.-m. (1998). Activation of E2F-mediated Transcription by Human T-cell Leukemia Virus Type I Tax Protein in a p16 INK4A -negative T-cell Line. *J.Biol.Chem.* 273, 23598–23604.
- [Levin-Salomon et al., 2014] Levin-Salomon, V., Bialik, S. and Kimchi, A. (2014). DAP-kinase and autophagy. *Apoptosis* 19, 346–356.
- [Lim and Kaldis, 2013] Lim, S. and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs : roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–93.
- [Lin and Wang, 2004] Lin, X. and Wang, D. (2004). The roles of CARMA1, Bcl10, and MALT1 in antigen receptor signaling. *Seminars in Immunology* 16, 429–435.
- [Liu et al., 2014] Liu, B., Fang, M., Hu, Y., Huang, B., Li, N., Chang, C., Huang, R., Xu, X., Yang, Z., Chen, Z. and Liu, W. (2014). Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy* 10, 416–430.
- [Liu et al., 2005] Liu, B., Hong, S., Tang, Z., Yu, H. and Giam, C.-Z. (2005). HTLV-I Tax directly binds the Cdc20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule. *PNAS* 102, 63–8.
- [Liu et al., 2008] Liu, M., Yang, L., Zhang, L., Liu, B., Merling, R., Xia, Z. and Giam, C.-Z. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 infection leads to arrest in the G1 phase of the cell cycle. *Journal of virology* 82, 8442–55.
- [Lodewick et al., 2009] 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- κ B pathway. *Virology* 386, 68–78.

BIBLIOGRAPHIE

- [MacNamara et al., 2010] MacNamara, A., Rowan, A., Hilburn, S., Kadolsky, U., Fujiwara, H., Suemori, K., Yasukawa, M., Taylor, G., Bangham, C. R. M. and Asquith, B. (2010). HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathogens* *6*.
- [Maeda et al., 2008] Maeda, N., Fan, H. and Yoshikai, Y. (2008). Oncogenesis by retroviruses : old and new paradigms. *Reviews in medical virology* *19*, 57–64.
- [Mahgoub et al., 2017] Mahgoub, M., Yasunaga, J., Shimura, K., Furuta, R. and Matsuoka, M. (2017). Transient Tax Expression is Essential for ATL Survival : Insight Based on Single Cell Analysis. Conférence présentée lors du *18^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine*.
- [Mahieux and Gessain, 2011] 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 et al., 2000a] Mahieux, R., Pise-Masison, C. a., Lambert, P. F., Nicot, C., De Marchis, L., Gessain, a., Green, P., Hall, W. and Brady, J. N. (2000a). Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *Journal of virology* *74*, 6866–6874.
- [Mahieux et al., 2000b] Mahieux, R., Pise-Masison, C. A., Nicot, C., Green, P., Hall, W. W. and Brady, J. N. (2000b). Inactivation of p53 by HTLV type 1 and HTLV type 2 Tax trans-activators. *AIDS Res Hum Retroviruses* *16*, 1677–1681.
- [Maiuri et al., 2007] Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O. and Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal* *26*, 2527–39.
- [Majorovits et al., 2008] 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*, 1–10.
- [Makokha et al., 2013] Makokha, G. N., Takahashi, M., Higuchi, M., Saito, S., Tanaka, Y. and Fujii, M. (2013). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Science* *104*, 313–320.
- [Maldonado et al., 2014] Maldonado, J. O., Martin, J. L., Mueller, J. D., Zhang, W. and Mansky, L. M. (2014). New insights into retroviral Gag-Gag and Gag-membrane interactions. *Frontiers in Microbiology* *5*, 1–7.
- [Man et al., 2008] Man, L. Y., Yasunaga, J. I., Bennasser, Y., Dusetti, 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 Research* *68*, 8976–8985.
- [Manel et al., 2003] 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.
- [Mansky et al., 2017] Mansky, L. M., Eichorst, J., Martin, J., Maldonado, J. O., Mendonça, L., Cao, S., Zhang, W. and Mueller, J. D. (2017). Studies of HTLV-1 Particle Biogenesis by Live-Cell Imaging and Cryoelectron Microscopy/Tomography. Conférence présentée lors du *18^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine*.
- [Martin et al., 2015] Martin, E., Mahieux, R. and Journo, C. (2015). HTLV-1 Tax targets centrosomal Cep63 protein. Poster présenté lors du *17^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine*.

- [Martin et al., 2006] Martin, P., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. (2006). The signaling adapter p62 is an important mediator of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation. *The EMBO journal* *25*, 3524–3533.
- [Martinez-Outschoorn et al., 2010] Martinez-Outschoorn, U. E., Trimmer, C., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Zhou, J., Wang, C., Pavlides, S., Martinez-Cantarín, M. P., Capozza, F., Witkiewicz, A. K., Flomenberg, N., Howell, A., Pestell, R. G., Caro, J., Lisanti, M. P. and Sotgia, F. (2010). Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival : Role of hypoxia, HIF1 induction and NF- κ B activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* *9*, 3515–3533.
- [Maréchal, 2007] Maréchal, V. (2007). Virus en embuscade dans l’organisme. *Les Dossiers de Pour la Science* *2*.
- [Mateo et al., 2013] Mateo, R., Nagamine, C. M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Yuan, J. and Kirkegaard, K. (2013). Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *Journal of virology* *87*, 1312–21.
- [Matsuda and Tanaka, 2010] Matsuda, N. and Tanaka, K. (2010). Uncovering the roles of PINK1 and parkin in mitophagy. *Autophagy* *6*, 952–954.
- [Matsuoka, 2010] Matsuoka, M. (2010). HTLV-1 bZIP factor gene : Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Molecular Aspects of Medicine* *31*, 359–366.
- [Matsuoka and Jeang, 2007] 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.
- [Matsuura et al., 1997] Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *192*, 245–250.
- [May et al., 2000] May, M. J., D’Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S. and Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science* *289*, 1550–1554.
- [McAllister-Lucas et al., 2001] McAllister-Lucas, L. M., Onohara, N., Lucas, P. C., Ruland, J., Benito, A., Li, Q., Chen, S., Chen, F., Yamaoka, S., Verma, I., Mak, T. and Nunez, G. (2001). Bimp1, a MAGUK Family Member Linking Protein Kinase C Activation to Bcl10-mediated NF- κ B Induction. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 30589–30597.
- [Meekings et al., 2008] Meekings, K. N., Leipzig, J., Bushman, F. D., Taylor, G. P. and Bangham, C. R. M. (2008). HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathogens* *4*.
- [Meertens et al., 2004] 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. *The Journal of biological chemistry* *279*, 43307–20.
- [Melamed et al., 2013] 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 Pathogens* *9*, 1–13.
- [Mizushima et al., 1998] Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395–398.

BIBLIOGRAPHIE

- [Mori et al., 1999] Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D. W. and Yamamoto, N. (1999). Constitutive Activation of NF- κ B in Primary Adult T-Cell Leukemia Cells. *Blood* 93, 2360–2368.
- [Moriuchi et al., 2017] Moriuchi, H., Takeda, N., Nakashima, Y., Doi, H., Miura, K., Masuzaki, H., Sasaki, D., Hasegawa, H. and Yanagihara, K. (2017). Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 : Unreliability of Short-Term Breastfeeding as a Preventive Measure and PCR Tests as a Diagnostic Method. Conférence présentée lors du 18^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine.
- [Morozov et al., 2004] Morozov, V. A., Lagaye, S., Löwer, J. and Löwer, R. (2004). Detection and characterization of β retroviral sequences, related to sheep Jaagsiekte virus, in Africans from Nigeria and Cameroon. *Virology* 327, 162–168.
- [Morselli et al., 2011] Morselli, E., Shen, S., Ruckenstuhl, C., Bauer, M. A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M. C., Chano, T., Madeo, F. and Kroemer, G. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle* 10, 2763–2769.
- [Moscat et al., 2007] Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. and Wooten, M. W. (2007). Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 95–100.
- [Mosialos, 1997] Mosialos, G. (1997). The role of Rel/NF- κ B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Seminars in cancer biology* 8, 121–129.
- [Moy et al., 2014] Moy, R. H., Gold, B., Molleston, J. M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M. V., Yagi, Y., Fitzgerald, K. A., Stanger, B. Z., Soldan, S. S. and Cherry, S. (2014). Antiviral autophagy restricts rift valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* 40, 51–65.
- [Mukai and Ohshima, 2014] Mukai, R. and Ohshima, T. (2014). HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. *Oncogene* 33, 2317–28.
- [Mukai and Ohshima, 2017] Mukai, R. and Ohshima, T. (2017). Molecular Mechanisms of HBZ-Mediated MCL1 Stability in HTLV-1 Infected Cells. Poster présenté lors du 18^e Congrès International de Rétrovirologie Humaine.
- [Nagafuji et al., 1993] Nagafuji, K., Harada, M., Teshima, T., Eto, T., Takamatsu, Y., Okamura, T., Murakawa, M., Akashi, K. and Niho, Y. (1993). Hematopoietic progenitor cells from patients with adult T-cell leukemia- lymphoma are not infected with human T-cell leukemia virus type 1. *Blood* 82, 2823–2828.
- [Narendra et al., 2010] Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R. and Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biology* 8.
- [Nasr et al., 2006] Nasr, R., Chiari, E., El-sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., Thé, H. D., Pique, C., Bazarbachi, A., Dc, W., Nasr, R., Chiari, E., El-sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., The, H. D., Pique, C. and Bazarbachi, A. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* 107, 4021–4029.

- [Nasr et al., 2017] Nasr, R., Marçais, A., Hermine, O. and Bazarbachi, A. (2017). Overview of Targeted Therapies for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma pp. 197–216. New York, NY : Springer New York.
- [Neel et al., 1981] Neel, B. G., Hayward, W. S., Robinson, H. L., Fang, J. and Astrin, S. M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs : oncogenesis by promoter insertion. *Cell* , *23*, 323–334.
- [Nejmeddine et al., 2005] 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. *Journal of Biological Chemistry* , *280*, 29653–29660.
- [Nemoto et al., 2003] Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno, T. and Kominami, E. (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *Journal of Biological Chemistry* , *278*, 39517–39526.
- [Newbound et al., 1996] Newbound, G. C., Andrews, J. M., O’Rourke, J. P., Brady, J. N. and Lairmore, M. D. (1996). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax mediates enhanced transcription in CD4+ T lymphocytes. *Journal of Virology* , *70*, 2101–2106.
- [Ni et al., 2008] 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., Ballard, D. W. and Oltz, E. M. (2008). Cutting edge : K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* , *180*, 7107–11.
- [Nicholson and Cimini, 2015] Nicholson, J. M. and Cimini, D. (2015). Link between Aneuploidy and Chromosome Instability, vol. 315,. Elsevier Ltd.
- [Nicot et al., 2004] 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. *Nature medicine* *10*, 197–201.
- [Nicot et al., 2001] Nicot, C., Mulloy, J. C., Ferrari, M. G., Johnson, J. M., Fu, K., Fukumoto, R., Trovato, R., Fullen, J., Leonard, W. J. and Franchini, G. (2001). HTLV-1 p12I protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* *98*, 823–829.
- [Niida et al., 2010] Niida, M., Tanaka, M. and Kamitani, T. (2010). Downregulation of active IKK κ by Ro52-mediated autophagy. *Molecular Immunology* *47*, 2378–2387.
- [Niso-Santano et al., 2012] Niso-Santano, M., Criollo, A., Malik, S. A., Michaud, M., Mariño, G., Lachkar, S., Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2012). Direct molecular interactions between Beclin 1 and the canonical NF κ B activation pathway. *Autophagy* *8*, 268–270.
- [Nitta et al., 2006] Nitta, T., Kanai, M., Sugihara, E., Tanaka, M., Sun, B., Nagasawa, T., Sonoda, S., Saya, H. and Miwa, M. (2006). Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells. *Cancer Science* *97*, 836–841.
- [Nivon et al., 2009] Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.-P. and Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NF κ B is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* *5*, 766–83.
- [Novikoff, 1959] Novikoff, A. B. (1959). The Proximal Tubule Cell in Experimental Hydronephrosis. *The Journal of Cell Biology* *6*, 136–138.

BIBLIOGRAPHIE

- [Ohshima, 2015] Ohshima, K. (2015). Molecular Pathology of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Oncology* 89, 7–15.
- [Ohsugi et al., 2013] Ohsugi, T., Ishida, T., Shimasaki, T., Okada, S. and Umezawa, K. (2013). P53 dysfunction precedes the activation of nuclear factor- κ B during disease progression in mice expressing tax, a human t-cell leukemia virus type 1 oncoprotein. *Carcinogenesis* 34, 2129–2136.
- [Okajima et al., 2008] Okajima, M., Takahashi, M., Higuchi, M., Ohsawa, T., Yoshida, S., Yoshida, Y., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain-binding motif dependent and independent interaction. *Virus Genes* 37, 231–240.
- [Olière et al., 2010] Olière, S., Hernandez, E., Lézin, A., Arguello, M., Douville, R., Nguyen, T. L. A., Olindo, S., Panelatti, G., Kazanji, M., Wilkinson, P., Sékaly, R. P., Césaire, R. and Hiscott, J. (2010). HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathogens* 6.
- [Orvedahl et al., 2007] Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A. and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein. *Cell Host and Microbe* 1, 23–35.
- [Orvedahl et al., 2010] Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z. and Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell host & microbe* 7, 115–27.
- [Osame et al., 1986] Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M. and Tara, M. (1986). HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *The Lancet* 2, 104–5.
- [Pais-Correia et al., 2010] 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. *Nature medicine* 16, 83–9.
- [Palm and Medzhitov, 2009] Palm, N. W. and Medzhitov, R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 227, 221–233.
- [Panfil et al., 2016] Panfil, A. R., Dissinger, N. J., Howard, C. M., Murphy, B. M., Landes, K., Fernandez, S. A. and Green, P. L. (2016). Functional Comparison of HBZ and the Related APH-2 Protein Provide Insight into HTLV-1 Pathogenesis. *Journal of virology* 90, 3760–3772.
- [Pankiv et al., 2010] Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Øvervatn, A., Bjørkøy, G. and Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end - Directed vesicle transport. *Journal of Cell Biology* 188, 253–269.
- [Pankiv et al., 2007] Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G. and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24131–24145.
- [Papinski et al., 2014] Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., Lee, S., Brezovich, A., Lou, J., Turk, B. E., Aebersold, R., Ammerer, G., Peter, M. and Kraft, C. (2014). Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase. *Molecular Cell* 53, 471–483.

- [Park et al., 2004] 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.
- [Pattingre et al., 2005] Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- [Paul et al., 2012] Paul, S., Kashyap, A. K., Jia, W., He, Y. W. and Schaefer, B. C. (2012). Selective Autophagy of the Adaptor Protein Bcl10 Modulates T Cell Receptor Activation of NF- κ B. *Immunity* 36, 947–958.
- [Paul and Schaefer, 2013] Paul, S. and Schaefer, B. C. (2013). A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- κ B. *Trends in Immunology* 34, 269–281.
- [Paul et al., 2014] Paul, S., Traver, M. K., Kashyap, A. K., Washington, M. a., Latoche, J. R. and Schaefer, B. C. (2014). T Cell Receptor Signals to NF- κ B Are Transmitted by a Cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK Signalosome. *Science signaling* 7, ra45.
- [Peloponese et al., 2005] 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. *PNAS* 102, 18974–18979.
- [Peloponese and Jeang, 2006] 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. *The Journal of biological chemistry* 281, 8927–38.
- [Pene et al., 2014] Pene, S., Waast, L., Bonnet, a., Benit, L. and Pique, C. (2014). A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF- B Pathway Activation. *Journal of Virology* 88, 10655–10661.
- [Petiot et al., 2000] Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F. C., Meijer, A. J. and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 992–998.
- [Philip et al., 2014] Philip, S., Zahoor, M. A., Zhi, H., Ho, Y. K. and Giam, C. Z. (2014). Regulation of Human T-Lymphotropic Virus Type I Latency and Reactivation by HBZ and Rex. *PLoS Pathogens* 10.
- [Pichler et al., 2017] Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H. and Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation – a mechanistic view. *BioMol Concepts* 8, 13–36.
- [Pique et al., 1990] Pique, C., Tursz, T. and Dokhelar, M. C. (1990). Mutations introduced along the HTLV-I envelope gene result in a non-functional protein : a basis for envelope conservation ? *Embo J* 9, 4243–4248.
- [Pique et al., 2000] Pique, C., Ureta-Vidal, A., Gessain, A., Chancerel, B., Gout, O., Tamouza, R., Agis, F. and Dokhelar, M. C. (2000). Evidence for the chronic in vivo production of human T cell leukemia virus type I Rof and Tof proteins from cytotoxic T lymphocytes directed against viral peptides. *Journal of Experimental Medicine* 191, 567–572.
- [Pise-Masison et al., 2000] Pise-Masison, C. a., Mahieux, R., Radonovich, M., Jiang, H., Duvall, J., Guillermin, C. and Brady, J. N. (2000). Insights into the molecular mechanism of p53 inhibition by HTLV type 1 Tax. *AIDS research and human retroviruses* 16, 1669–75.

BIBLIOGRAPHIE

- [Poiesz et al., 1980] 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. *PNAS* *77*, 7415–9.
- [Pujari et al., 2015] 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 Pathogens* *11*, 1–27.
- [Qing et al., 2007] Qing, G., Yan, P., Qu, Z., Liu, H. and Xiao, G. (2007). Hsp90 regulates processing of NF- κ B p100 involving protection of NF- κ B-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell Res* *17*, 520–530.
- [Qing et al., 2006] Qing, G., Yan, P. and Xiao, G. (2006). Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of I κ B kinase (IKK). *Cell research* *16*, 895–901.
- [Rahman et al., 2012] Rahman, S., Quann, K., Pandya, D., Singh, S., Khan, Z. K. and Jain, P. (2012). HTLV-1 tax mediated downregulation of miRNAs associated with chromatin remodeling factors in T cells with stably integrated viral promoter. *PLoS ONE* *7*.
- [Ren et al., 2012] Ren, T., Dong, W., Takahashi, Y., Xiang, D., Yuan, Y., Liu, X., Loughran, T. P., Sun, S. C., Wang, H. G. and Cheng, H. (2012). HTLV-2 tax immortalizes human CD4+ memory T lymphocytes by oncogenic activation and dysregulation of autophagy. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 34683–34693.
- [Ren et al., 2015] Ren, T., Takahashi, Y., Liu, X., Loughran, T. P., Sun, S.-C., Wang, H.-G. and Cheng, H. (2015). HTLV-1 Tax deregulates autophagy by recruiting autophagic molecules into lipid raft microdomains. *Oncogene* *34*, 373–384.
- [Richard et al., 2016] Richard, L., Mouinga-Ondémé, A., Betsem, E., Filippone, C., Nerrienet, E., Kazanji, M. and Gessain, A. (2016). Zoonotic transmission of two new strains of Human T Lymphotropic Virus type 4 in hunters bitten by a gorilla in Central Africa Accepted. *Clinical Infectious Diseases* *63*, 1–2.
- [Richardson et al., 1990] Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P. and Dalglish, A. G. (1990). In Vivo Cellular Tropism of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *Journal of Virology* *64*, 5682–5687.
- [Rizkallah et al., 2017] Rizkallah, G., Alais, S., Futsch, N., Tanaka, Y., Journo, C., Mahieux, R. and Dutartre, H. (2017). Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. *PLOS Pathogens* *13*, 1–29.
- [Rizkallah et al., 2015] Rizkallah, G., Mahieux, R. and Dutartre, H. (2015). Transmission intercellulaire de HTLV-1. *Medecine/Sciences* *31*, 629–637.
- [Robek et al., 1998] Robek, M. D., Wong, F. H. and Ratner, L. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 pX-I and pX-II open reading frames are dispensable for the immortalization of primary lymphocytes. *Journal of virology* *72*, 4458–62.
- [Roberts et al., 2003] Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O’Toole, E., Winey, M. and Goldfarb, D. (2003). Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* *14*, 2372–2384.

- [Romanelli et al., 2013] 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. *Frontiers in Microbiology* *4*, 271.
- [Rosenberg et al., 1997] Rosenberg, A. R., Delamarre, L., Pique, C., Pham, D. and Dokh elar, M. C. (1997). The ectodomain of the human T-cell leukemia virus type 1 TM glycoprotein is involved in postfusion events. *Journal of virology* *71*, 7180–7186.
- [Rossmann et al., 2006] Rossmann, J., Stoicheva, N., Langel, F., Patterson, G., Lippincott-Schwartz, J. and Schaefer, B. C. (2006). POLKADOTS Are Foci of Functional Interactions in T-Cell Receptor-mediated Signaling to NF- κ B. *Molecular Biology of the Cell* *17*, 2166–2176.
- [Rous, 1911] Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible By an Agent Separable From the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine* *13*, 397–411.
- [Sagnier et al., 2015] Sagnier, S., Daussy, C. F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F. P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M. and Espert, L. (2015). Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *Journal of virology* *89*, 615–25.
- [Sahlender et al., 2005] Sahlender, D. A., Roberts, R. C., Arden, S. D., Spudich, G., Taylor, M. J., Luzio, J. P., Kendrick-Jones, J. and Buss, F. (2005). Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *The Journal of Cell Biology* *169*, 285–295.
- [Sakai et al., 1998] Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L. K., Keller, G. a. and Subramani, S. (1998). Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris* : Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. *Journal of Cell Biology* *141*, 625–636.
- [Sakoh-Nakatogawa et al., 2013] Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E., Kirisako, H., Ishii, J., Noda, N. N., Inagaki, F., Nakatogawa, H. and Ohsumi, Y. (2013). Atg12–Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nature Structural & Molecular Biology* *20*, 433–439.
- [Sampey et al., 2012] Sampey, G. C., Van Duyne, R., Currer, R., Das, R., Narayanan, A. and Kashanchi, F. (2012). Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections. *Frontiers in Genetics* *3*, 1–16.
- [Sancak et al., 2010] Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S. and Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.
- [Sancak et al., 2008] Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L. and Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–501.
- [Santiago et al., 1999] 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. *Journal of virology* *73*, 9917–27.
- [Sanz et al., 2000] Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H. and Moscat, J. (2000). The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- κ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *The EMBO journal* *19*, 1576–86.

BIBLIOGRAPHIE

- [Sanz et al., 1999] Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- κ B activation. *The EMBO Journal* *18*, 3044–3053.
- [Sarid and Gao, 2011] Sarid, R. and Gao, S.-J. (2011). Viruses and human cancer : from detection to causality. *Cancer letters* *305*, 218–227.
- [Sarngadharan et al., 1972] Sarngadharan, M., Sarin, P., Reitz, M. and Gallo, R. C. (1972). Reverse Transcriptase Activity of Human Acute Leukaemic Cells : Purification of the Enzyme, Response to AMV 70S RNA, and characterization of the DNA Product. *Nature New Biology* *240*, 67–72.
- [Sasai et al., 2010] Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T. (2010). Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molecular Immunology* *47*, 1283–1291.
- [Sato et al., 2005] Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* *6*, 1087–95.
- [Satou et al., 2006] Satou, Y., Yasunaga, J.-i., Yoshida, M. and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *PNAS* *103*, 720–5.
- [Schaefer et al., 2004] Schaefer, B. C., Kappler, J. W., Kupfer, A. and Marrack, P. (2004). Complex and dynamic redistribution of NF- κ B signaling intermediates in response to T cell receptor stimulation. *PNAS* *101*, 1004–9.
- [Schlottmann et al., 2008] Schlottmann, S., Buback, F., Stahl, B., Meierhenrich, R., Walther, P., Georgieff, M. and Senftleben, U. (2008). Prolonged classical NF- κ B activation prevents autophagy upon *E. coli* stimulation in vitro : A potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators of Inflammation* *2008*, 1–15.
- [Schröder et al., 2002] Schröder, A. R. W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* *110*, 521–9.
- [Seibold and Ehrenschrwender, 2015] Seibold, K. and Ehrenschrwender, M. (2015). p62 regulates CD40-mediated NF κ B activation in macrophages through interaction with TRAF6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *464*, 330–335.
- [Senftleben et al., 2001] Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. and Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* *293*, 1495–1499.
- [Sengupta and Harris, 2005] Sengupta, S. and Harris, C. C. (2005). p53 : traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 44–55.
- [Shaw et al., 1984] Shaw, G. M., Gonda, M. A., Flickinger, G. H., Hahn, B. H., Gallo, R. C. and Wong-Staal, F. (1984). Genomes of evolutionarily divergent members of the human T-cell leukemia virus family (HTLV-I and HTLV-II) are highly conserved, especially in pX. *PNAS* *81*, 4544–4548.
- [Shaw et al., 2008] Shaw, J., Yurkova, N., Zhang, T., Gang, H., Aguilar, F., Weidman, D., Scramstad, C., Weisman, H. and Kirshenbaum, L. a. (2008). Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *PNAS* *105*, 20734–9.

- [Shembade et al., 2007] 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. *Journal of virology* *81*, 13735–42.
- [Shembade et al., 2011] 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. *Nature immunology* *12*, 834–843.
- [Shi and Kehrl, 2010] Shi, C. S. and Kehrl, J. H. (2010). Traf6 and A20 differentially regulate TLR4-induced autophagy by affecting the ubiquitination of Beclin 1. *Autophagy* *6*, 986–987.
- [Shi et al., 2013] Shi, J., Wong, J., Piesik, P., Fung, G., Zhang, J., Jagdeo, J., Li, L., Jan, E. and Luo, H. (2013). Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFKB signaling. *Autophagy* *9*, 1591–1603.
- [Shibata et al., 2011] 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. *Journal of Biochemistry* *150*, 679–686.
- [Shibata et al., 2017] Shibata, Y., Tokunaga, F., Goto, E., Komatsu, G., Gohda, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Inoue, S., Oshiumi, H., Seya, T., Nakano, H., Tanaka, Y., Iwai, K. and Inoue, J.-i. (2017). HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLOS Pathogens* *13*, e1006162.
- [Shibutani and Yoshimori, 2014] Shibutani, S. T. and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell research* *24*, 58–68.
- [Shimoyama, 1991] 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). *British Journal of Haematology* *79*, 428–437.
- [Shirinian et al., 2015] Shirinian, M., Kambris, Z., Hamadeh, L., Grabbe, C., Journo, C., Mahieux, R. and Bazarbachi, A. (2015). A transgenic *Drosophila melanogaster* model to study Human T-Lymphotropic Virus oncoprotein Tax-1-driven transformation in vivo. *Journal of virology* *89*, 8092–8095.
- [Shirinian et al., 2013] 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. *Frontiers in Microbiology* *4*, 1–13.
- [Shope and Hurst, 1933] Shope, R. E. and Hurst, E. W. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* *58*, 607–624.
- [Siebenlist et al., 1994] Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Bioi* *10*, 405–55.
- [Siegel et al., 1998] Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J. and Lenardo, M. J. (1998). Death-effector filaments : Novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *Journal of Cell Biology* *141*, 1243–1253.
- [Silbermann et al., 2008] Silbermann, K., Schneider, G. and Grassmann, R. (2008). Stimulation of interleukin-13 expression by human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax via a dually active promoter element responsive to NF- κ B and NFAT. *Journal of General Virology* *89*, 2788–2798.

BIBLIOGRAPHIE

- [Silic-Benussi et al., 2010] Silic-Benussi, M., Cavallari, I., Vajente, N., Vidali, S., Chieco-Bianchi, L., Di Lisa, F., Saggiaro, D., D'Agostino, D. M. and Ciminale, V. (2010). Redox regulation of T-cell turnover by the p13 protein of human T-cell leukemia virus type 1 : distinct effects in primary versus transformed cells. *Blood* *116*, 54–62.
- [Simonis et al., 2012] Simonis, N., Rual, J.-F., Lemmens, I., Boxus, M., Hirozane-Kishikawa, T., Gatot, J.-S., Dricot, A., Hao, T., Vertommen, D., Legros, S., Daakour, S., Klitgord, N., Martin, M., Willaert, J.-F., Dequiedt, F., Navratil, V., Cusick, M. E., Burny, A., Van Lint, C., Hill, D. E., Tavernier, J., Kettmann, R., Vidal, M. and Twizere, J.-C. (2012). Host-pathogen interactome mapping for HTLV-1 and -2 retroviruses. *Retrovirology* *9*, 26.
- [Siu et al., 2006] 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. *Journal of virology* *80*, 7052–7059.
- [Slamon et al., 1985] Slamon, D. J., Press, M. F., Souza, L. M., Murdock, D. C., Cline, M. J., Golde, D. W., Gasson, J. C. and Chen, I. S. (1985). Studies of the putative transforming protein of the type I human T-cell leukemia virus. *Science* *228*, 1427–1430.
- [Smith and Greene, 1990] Smith, M. R. and Greene, W. C. (1990). Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes and Development* *4*, 1875–1885.
- [Sodroski et al., 1984] Sodroski, J. G., Rosen, C. A. and Haseltine, W. A. (1984). Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* *225*, 381–385.
- [Song et al., 2005] Song, G., Ouyang, G. and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *9*, 59–71.
- [Stehelin et al., 1976] Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, J. and Vogt, P. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* *260*, 774–776.
- [Sugata et al., 2016] Sugata, K., Yasunaga, J. I., Kinosada, H., Mitobe, Y., Furuta, R., Mahgoub, M., Onishi, C., Nakashima, K., Ohshima, K. and Matsuoka, M. (2016). Htlv-1 viral factor hzb induces ccr4 to promote t-cell migration and proliferation. *Cancer Research* *76*, 5068–5079.
- [Sumpter and Levine, 2011] Sumpter, R. and Levine, B. (2011). Selective autophagy and viruses. *Autophagy* *7*, 260–265.
- [Sun and Karin, 2008] Sun, B. and Karin, M. (2008). NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* *27*, 6228–44.
- [Sun et al., 2004] 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. *Molecular Cell* *14*, 289–301.
- [Sun and Cesarman, 2011] Sun, S.-c. and Cesarman, E. (2011). NF- κ B as a target for oncogenic viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* *349*, 23–27.
- [Sun et al., 1994] Sun, S.-C., Elwood, J., Béraud, C. and Greene, W. C. (1994). Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax Activation of NF- κ B/Rel Involves Phosphorylation and Degradation of I κ B α and RelA (p65)-Mediated Induction of the c-rel Gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7377–7384.

- [Suzuki et al., 2010] Suzuki, S., Zhou, Y., Refaat, A., Takasaki, I., Koizumi, K., Yamaoka, S., Tabuchi, Y., Saiki, I. and Sakurai, H. (2010). Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 4441–4446.
- [Svenning and Johansen, 2013] Svenning, S. and Johansen, T. (2013). Selective autophagy. *Essays In Biochemistry* *55*, 79–92.
- [Svenning et al., 2011] Svenning, S., Lamark, T., Krause, K. and Johansen, T. (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* *7*, 993–1010.
- [Takamori et al., 2011] Takamori, A., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Maeda, Y., Yamano, Y., Masuda, M., Shimizu, Y., Tamai, Y., Sasada, A., Zeng, N., Choi, I., Uike, N., Okamura, J., Watanabe, T., Masuda, T. and Kannagi, M. (2011). Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology* *8*, 100.
- [Takeda et al., 2004] 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. *International Journal of Cancer* *109*, 559–567.
- [Tamiya et al., 1996] Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* *88*, 3065–3073.
- [Tanaka et al., 1990] 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. *PNAS* *87*, 1071–1075.
- [Tanaka et al., 1996] Tanaka, Y., Hayashi, M., Takagi, S. and Yoshie, O. (1996). Differential transactivation of the intercellular adhesion molecule 1 gene promoter by Tax1 and Tax2 of human T-cell leukemia viruses. *Journal of virology* *70*, 8508–8517.
- [Tang et al., 2013] Tang, S. W., Chen, C. Y., Klase, Z., Zane, L. and Jeang, K. T. (2013). The Cellular Autophagy Pathway Modulates Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Replication. *Journal of Virology* *87*, 1699–1707.
- [Tanida et al., 2001] Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T. and Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 1701–1706.
- [Taniguchi et al., 2005] Taniguchi, Y., Nosaka, K., Yasunaga, J.-i., Maeda, M., Mueller, N., Okayama, A. and Matsuoka, M. (2005). Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* *2*, 64.
- [Tasdemir et al., 2008] Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D’Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., Moll, U. M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szabadkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F. and Kroemer, G. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* *10*, 676–687.

BIBLIOGRAPHIE

- [Thébault et al., 2004] Thébault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. and Mesnard, J. M. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Letters* 562, 165–170.
- [Thurston et al., 2009] Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N. and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nature immunology* 10, 1215–1221.
- [Tomita, 2012] Tomita, M. (2012). Important Roles of Cellular MicroRNA miR-155 in Leukemogenesis by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection. *ISRN Microbiology* 2012, 1–11.
- [Tomita et al., 2012] Tomita, M., Tanaka, Y. and Mori, N. (2012). MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *International Journal of Cancer* 130, 2300–2309.
- [Toulza et al., 2010] 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. *Journal of immunology* 185, 183–189.
- [Tripp et al., 2005] Tripp, A., Banerjee, P., Sieburg, M., Planelles, V., Li, F., Feuer, G., Al, T. E. T. and Irol, J. V. (2005). Induction of Cell Cycle Arrest by Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Tax in Hematopoietic Progenitor (CD34+) Cells : Modulation of p21 cip1 / waf1 and p27 kip1 Expression. *Journal of virology* 79, 14069–14078.
- [Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011] Trocoli, A. and Djavaheri-Mergny, M. (2011). The complex interplay between autophagy and NF- κ B signaling pathways in cancer cells. *American journal of cancer research* 1, 629–49.
- [Trompouki et al., 2003] Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschirritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* 107, 793–796.
- [Tsukada and Ohsumi, 1993] Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal* 333, 169–174.
- [Tumbarello et al., 2015] Tumbarello, D. A., Manna, P. T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S. D., Kendrick-Jones, J. and Buss, F. (2015). The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathogens* 11, e1005174.
- [Tumbarello et al., 2012] Tumbarello, D. a., Waxse, B. J., Arden, S. D., Bright, N. a., Kendrick-Jones, J. and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nature cell biology* 14, 1024–1035.
- [Uchiyama et al., 1977] 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.
- [Van Prooyen et al., 2010] 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. *PNAS* 107, 20738–20743.
- [Verlhac, 2016] Verlhac, P. (2016). A new regulator of autophagosome maturation. Conférence présentée lors des 6^e *Journées Scientifiques du Club Francophone de l'Autophagie*.

- [Verlhac et al., 2015] Verlhac, P., Grégoire, I. P., Azocar, O., Petkova, D. S., Baguet, J., Viret, C. and Faure, M. (2015). Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host and Microbe* *17*, 515–525.
- [Vernin et al., 2014] 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 Research* *74*, 6082–6093.
- [Villalba et al., 2000] Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P. and Altman, a. (2000). A novel functional interaction between Vav and PKC θ is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* *12*, 151–160.
- [Wang et al., 2016] Wang, C., Long, W., Peng, C., Hu, L., Zhang, Q., Wu, A., Zhang, X., Duan, X., Wong, C. C. L., Tanaka, Y. and Xia, Z. (2016). HTLV-1 Tax Functions as a Ubiquitin E3 Ligase for Direct IKK Activation via Synthesis of Mixed-Linkage Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathogens* *12*, 1–25.
- [Wang et al., 2017] Wang, J., Yang, S., Liu, L., Wang, H. and Yang, B. (2017). HTLV-1 Tax impairs K63-linked ubiquitination of STING to evade host innate immunity. *Virus Research* *232*, 13–21.
- [Wang et al., 1976] Wang, L.-H., Duesberg, P., Mellon, P. and Vogt, P. (1976). Distribution of envelope-specific and sarcoma-specific nucleotide sequences from different parents in the RNAs of avian tumor virus recombinants. *PNAS* *73*, 1073–1077.
- [Wang et al., 2014] 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. *Journal of virology* *88*, 2786–98.
- [Wang et al., 2012] Wang, X., Gao, Y., Tan, J., Devadas, K., Ragupathy, V., Takeda, K., Zhao, J. and Hewlett, I. (2012). HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4⁺ T cells. *Cellular Signalling* *24*, 1414–1419.
- [Wei et al., 2008] Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. and Levine, B. (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell* *30*, 678–688.
- [Wiktor et al., 1993] Wiktor, S., Pate, E., Murphy, E., Palker, T. J., Champegnie, E., Ramlal, A., Cranston, B., Hanchard, B. and Blattner, W. (1993). Mother-to-Child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) in Jamaica : Association with Antibodies to Envelope Glycoprotein (gp46) Epitopes. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* *6*, 1162–7.
- [Wild et al., 2011] Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dötsch, V., Bumann, D. and Dikic, I. (2011). Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella. *Science* *333*, 228–233.
- [Wolfe et al., 2005] Wolfe, N. D., Heneine, W., Carr, J. K., Garcia, A. D., Tamoufe, U., Torimiro, J. N., Prosser, A. T., Lebreton, M., Mccutchan, F. E., Birx, D. L., Folks, T. M., Burke, D. S., Switzer, W. M., Coffin, J. M., Carrfl, J. K., Shanmugam, V., Torimiroll, J. N., Prossert, A. T., Lebretonil, M., Mpoudi-Ngole, E., Mccutchan, F., Birx, D., Folks, T., Burke, D. and Switzer, W. M. (2005). Emergence of among central unique African primate viruses bushmeat hunters. *PNAS* *102*, 7994–7999.

BIBLIOGRAPHIE

- [Wooten et al., 2005] Wooten, M. W., Geetha, T., Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF- κ B activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 35625–35629.
- [Wooten et al., 2001] Wooten, M. W., Seibenhener, M. L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M. T., Barker, P. A. and Moscat, J. (2001). The Atypical Protein Kinase C-interacting Protein p62 Is a Scaffold for NF- κ B Activation by Nerve Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 7709–7712.
- [Wu et al., 2011] Wu, X., Zhang, M. and Sun, S.-C. (2011). Mutual regulation between deubiquitinase CYLD and retroviral oncoprotein Tax. *Cell & bioscience* *1*, 27.
- [Xia et al., 2014] Xia, Y., Shen, S. and Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer immunology research* *2*, 823–30.
- [Xiao et al., 2001] Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, a., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M. and Sun, S. C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF- κ B2/p100 in T cells : evidence for the involvement of IKK α . *The EMBO journal* *20*, 6805–6815.
- [Xiao et al., 2004] Xiao, G., Fong, A. and Sun, S. C. (2004). Induction of p100 processing by NF- κ B-inducing kinase involves docking I κ B kinase α (IKK α) to p100 and IKK α -mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 30099–30105.
- [Xiao et al., 2001] Xiao, G., Harhaj, E. W. and Sun, S. C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Molecular Cell* *7*, 401–409.
- [Yamagishi et al., 2012] Yamagishi, M., Nakano, K., Miyake, A., Yamochi, T., Kagami, Y., Tsutsumi, A., Matsuda, Y., Sato-Otsubo, A., Muto, S., Utsunomiya, A., Yamaguchi, K., Uchimaru, K., Ogawa, S. and Watanabe, T. (2012). Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF- κ B Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* *21*, 121 – 135.
- [Yamaoka et al., 1996] Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T. and Hatanaka, M. (1996). Constitutive activation of NF- κ B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *The EMBO journal* *15*, 873–87.
- [Yan et al., 2007] Yan, P., Qing, G., Qu, Z., Wu, C.-C., Rabson, A. and Xiao, G. (2007). Targeting autophagic regulation of NF κ B in HTLV-I transformed cells by geldanamycin : implications for therapeutic interventions. *Autophagy* *3*, 600–603.
- [Yang et al., 2011] 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. *Journal of virology* *85*, 3001–9.
- [Yasunaga et al., 2011] 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- κ B signaling. *Journal of virology* *85*, 6212–6219.
- [Yoshida et al., 1982] Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *PNAS* *79*, 2031–2035.
- [Yoshida et al., 1984] Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K. (1984). Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *PNAS* *81*, 2534–2537. Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K.

- [Yoshie et al., 2002] Yoshie, O., Fujisawa, R., Nakayama, T., Harasawa, H., Tago, H., Izawa, D., Hieshima, K., Tatsumi, Y., Matsushima, K., Hasegawa, H., Kanamaru, A., Kamihira, S. and Yamada, Y. (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* *99*, 1505–1511.
- [Young et al., 2006] Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J. and Tooze, S. a. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science* *119*, 3888–3900.
- [Young et al., 2012] Young, M. M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A. K., Amin, S., Hu, C. D., Zhang, J., Kester, M. and Wang, H. G. (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 12455–12468.
- [Yuen et al., 2016] Yuen, C.-k., Chan, C.-p., Fung, S.-y., Wang, P.-h., Wong, W.-m., Tang, H.-m. V., Yuen, K.-s., Chan, C.-p., Jin, D.-y. and Kok, K.-h. (2016). Suppression of Type I Interferon Production by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Oncoprotein Tax through Inhibition of IRF3 Phosphorylation. *Journal of virology* *90*, 3902–3912.
- [Zachow et al., 1982] Zachow, K. R., Ostrow, R. S., Bender, M., Watts, S., Okagaki, T., Pass, F. and Faras, A. J. (1982). Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature* *300*, 771–773.
- [Zhang et al., 2016] Zhang, H., Chen, L., Cai, S.-h. and Cheng, H. (2016). Identification of TBK1 and IKK ϵ , the non-canonical I κ B kinases, as crucial pro-survival factors in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Leukemia Research* *46*, 37–44.
- [Zhao et al., 2015] Zhao, J., He, S., Minassian, A., Li, J. and Feng, P. (2015). Recent advances on viral manipulation of NF- κ B signaling pathway. *Current Opinion in Virology* *15*, 103–111.
- [Zhao et al., 2009] Zhao, T., Yasunaga, J. I., 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- κ B. *Blood* *113*, 2755–2764.
- [Zheng et al., 2009] Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T. and Brumell, J. H. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *Journal of immunology* *183*, 5909–5916.
- [Zhi et al., 2011] Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y. L., Ho, Y. K., Shih, H. M. and Giam, C. Z. (2011). NF- κ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathogens* *7*, 1–12.
- [Zhi et al., 2015] Zhi, H., Zahoor, M. a., Shudofsky, a. M. D. and Giam, C.-Z. (2015). KSHV vCyclin counters the senescence/G1 arrest response triggered by NF- κ B hyperactivation. *Oncogene* *34*, 496–505.
- [Zhirnov and Klenk, 2013] Zhirnov, O. P. and Klenk, H. D. (2013). Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells. *Journal of virology* *87*, 13107–14.
- [Zhong et al., 2016] Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S. R., McGeough, M. D., Ellisman, M. H., Seki, E., Gustafsson,

BIBLIOGRAPHIE

- A. B., Hoffman, H. M., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. and Karin, M. (2016). NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 164, 896–910.
- [Zhu et al., 2007] Zhu, G., Wu, C. J., Zhao, Y. and Ashwell, J. D. (2007). Optineurin Negatively Regulates TNF α - Induced NF- κ B Activation by Competing with NEMO for Ubiquitinated RIP. *Current Biology* 17, 1438–1443.
- [Zotti et al., 2014] Zotti, T., Scudiero, I., Settembre, P., Ferravante, A., Mazzone, P., D’Andrea, L., Reale, C., Vito, P. and Stilo, R. (2014). TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Molecular Immunology* 58, 27–31.
- [Zur Hausen et al., 1974] Zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. and Bornkamm, G. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumours. 1. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *International journal of cancer*. 13, 650–656.

Annexes

Liste des annexes :

- Materials and Methods
- Manuscrit en préparation
- Liste des communications en congrès
- Nouvelle publiée dans la revue Médecine / Science
- Brèves publiées dans la revue Virologie, avec des étudiants dans le cadre de l'UE de Virologie Structurale du Master Biosciences de l'ENS de Lyon

Materials and Methods

Cell culture HeLa and HEK 293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Wild-type and p62 knockout (p62^{-/-}) MEF cells were kindly provided by Dr. Toru Yanagawa. These cells were grown in high glucose, GlutaMAX Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). Non-infected Jurkat T cells (ATCC), HTLV-1-infected C8166 T cells (kind gift from Dr. Antoine Gessain), C91 T cells, and Hut102 T cells were grown in GlutaMAX Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂.

Constructs and siRNA pSG5M vectors encoding His-tagged Tax, Tax-K4-8R, Tax-K0, Tax-M22, Tax-M47, Tax-T351A, Tax-V353A, as well as pcDNA3 encoding VSV-tagged OPTN were previously described [Smith and Greene, 1990, Hirata et al., 2004, Chiari et al., 2004, Journo et al., 2009]. The HBZ-SP1 coding sequence was amplified from the pcDNA3.1-Myc-His vector (kind gift from Dr. Jean-Michel Mesnard) [Thébault et al., 2004] and cloned into the pSG5M backbone with a C-terminal His-tag.

Myc-p62 constructs cloned into the pCMV-Myc-Gat backbone were kindly provided by Dr. Anne-Sophie Nicot and Dr. Laurent Schaeffer. Myc-p62FL and Myc-p62 Δ UBA constructs cloned into pcDNA3-Myc backbone were kindly provided by Dr. Jorge Moscat [Wooten et al., 2005]. The p62 expression vectors, or their ENTR constructs, used for GST pulldown (pDEST15-p62, pDEST15-p62 Δ PB1, pDEST15-p62 Δ 123-170, pDEST15-p62 Δ 170-256, pDEST15-p62 Δ 256-370, pDEST15-p62 Δ 371-385 and pDEST15-p62 Δ UBA) or for MBP pulldown (pTH1-p62, pTH1-p62 Δ 170-256, pTH1-p62 Δ 170-221, pTH1-p62 Δ 221-256 and pTH1-p62(170-206)) have been described before [Clausen et al., 2010]. The NF- κ B-luciferase and HTLV-1-LTR-luciferase reporter gene plasmids were previously described [Meertens et al., 2004]. The FLAG-tagged IKK γ expression vector was used previously [Meertens et al., 2004].

NBR1 constructs cloned into pEGFP and pCMV-Myc-Gat backbone were kindly provided by Dr. Anne-Sophie Nicot and Dr. Laurent Schaeffer. NDP52-FLAG construct cloned into the pCR3-3xFlag backbone were kindly provided by Dr. Pauline Verlhac and Pr. Mathias Faure.

Non-targeting siRNA and p62-, ATG7- and BECN1-specific siRNA were purchased from Dharmacon. ATG5-specific siRNA was purchased from Thermo Fisher.

Antibodies The following antibodies were used : anti-His (ab916, Abcam or sc-804 Santa Cruz), anti-Tax1 (Tab172), anti-p62 (GP62-C, Progen), anti-GM130 (610823, BD), anti-VSV (V4888, Sigma-

Aldrich), anti-IKK γ (611306, BD), anti-ATG5 (A2228, Sigma-Aldrich), anti-ATG7 (A2856, Sigma-Aldrich), anti-Beclin1(B6186, Sigma-Aldrich), anti-LAMP1(BD Pharmingen, 555798), anti-LaminB1 (ab-16048, Abcam), anti- α -Tubulin (T6074, Sigma-Aldrich), anti-Rab5 (ab66746, Abcam), anti-Ub (sc-8017, Santa Cruz), anti-FLAG (M2, Sigma-Aldrich), anti-Myc (4A6, Millipore) and normal guinea pig IgG (sc-2711, Santa-Cruz).

Transient transfections HEK 293T and HeLa cells were transfected using either Polyfect or Effectene (Qiagen), or with DreamFect Gold (OZBiosciences). MEF cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). For siRNA transfections, Lipofectamine RNAiMax reagent (Life Technologies) was used. Jurkat cells were transfected using Neon electroporation system (Thermo Fisher). Cells were electroporated using constructor's instructions. 400 000 cells were pulsed 3 times with 2 μ g DNA during 10 ms at 1.325 V in 10 μ l Neon tips.

Immunoprecipitation, GST- and MBP-pulldown assays, Ni-NTA purification and western blot analyses For immunoprecipitation, cells were lysed for 20 min on ice in the following buffer : 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) as well as the phosphatase inhibitors NaF (100 mM) and Na₃VO₄ (2 mM). After scrapping, cell lysates were passed through 26G1/2 needles, centrifuged and protein concentration was quantified using the Bradford method (Biorad). Equal quantities of proteins were immunoprecipitated overnight at 4°C with anti-p62, anti-Myc antibodies or normal guinea pig IgG and Staphylococcus aureus Protein G sepharose beads (GE Healthcare). After 3 washes in lysis buffer, proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE. For GST- and MBP-pulldown assays, GST and GST-tagged proteins were expressed in E. coli soluBL21 (Amsbio) and immobilized on glutathione-coupled Sepharose beads (Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow ; GE Healthcare). MBP and MBP-tagged proteins were expressed in E. coli BL21(DE3) (Amsbio) and immobilized on amylose resin (New England Biolabs).

For anti-FLAG immunoprecipitation followed by His purification, cell lysates were incubated with an anti-FLAG M2 affinity gel (A2220, Sigma-Aldrich). After 3 washes in lysis buffer, bound proteins were eluted with 3X FLAG peptide (F4799, Sigma-Aldrich). His-specific purification was then performed using Ni-NTA His-select HF agarose beads (H0537, Sigma-Aldrich). After 3 washes in lysis buffer, proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE.

For control western blots, HEK293T cells were lysed for 20 min on ice in the following Ripa buffer : 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After centrifugation and protein concentration determination (Bradford, Biorad), proteins were analyzed by SDS-PAGE. Laemmli lysis were performed in following buffer : 50mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 5%

β -mercaptoethanol, 2% SDS and 0.1% Bromophenol blue.

Proteins were separated on 12% Bis-Tris gels (Criterion, Biorad) and transferred on PVDF membranes (Immobilon P, Millipore). After incubation in TBS-Tween (Sigma-Aldrich) containing 5% milk, membranes were incubated in primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (NA9310, GE Healthcare or #32430, Thermo Fisher), anti-rabbit IgG (NA9340, GE Healthcare or #32460, Thermo Fisher), anti-guinea pig Ig (P0141, Dako) were used as secondary antibodies, before revelation with ECL Prime (Amersham) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher) substrates.

Ni-NTA purification and ubiquitin analysis For ubiquitination analysis, transfected cells were lysed using Abis-Guanidium Buffer (10 mM Imidazole, 100 mM NaH₂PO₄, 6 M Guanidium). Cell lysates were then incubated with Ni-NTA beads at 4°C. Beads were then washed with Abis-Guanidium Buffer (10 mM Tris HCl pH 6.4, 100 mM NaH₂PO₄, 6 M Guanidium), Tris-HCl-Guanidium Buffer (25% Abis-Guanidium Buffer in Tris-HCl imidazole buffer) and Tris-HCl imidazole buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM Imidazole). Bound proteins were finally eluted and processed for immunoblot analysis.

Cellular fractionation Sub-cellular fractionation was performed on transfected cells using the Thermo Scientific Subcellular Protein Fractionation Kit (# 78840), following to the protocol described at the Figure 2.17. Cellular pellets were resuspended in constructor's cytosolic buffer before 500 g centrifugation. Supernatant were then collected and centrifugated again at 17 000 g. This supernatant is the cytosolic fraction. The pellet of the first centrifugation was then resuspended with constructor's membrane buffer before a 3 000g centrifugation. This pellet is resuspended in constructor's nuclera buffer, constituting the nuclear fraction. Finally, the membrane fraction is obtained by mixing the supernatant of the third centrifugation with the pellet of the second one. The obtained fractions were then analysed by Western blot using the nuclear, cytosolic and vesicular fraction markers Lamin B1, α -tubulin and Rab5, respectively.

Starvation-induced autophagy In order to induce autophagy, cells were cultivated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) medium for 6 hours. Cells were then analysed using Western blot.

Confocal microscopy HeLa cells were seeded on glass coverslips and transfected for 24 h. Jurkat and C8166 cells were seeded on polylysine-coated coverslips. All cells were fixed in 10% formalin solution (HT5011, Sigma-Aldrich), washed and permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100. After saturation in PBS containing 0.2% Tween (PBS-T) and 5% milk, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. After 3 washes in PBS-T, cells were incubated with Dylight 488 anti-mouse IgG (DI-2488, Vector), Dylight 488 anti-rabbit IgG (ab98488, Abcam), Dylight 549

anti-mouse IgG (DI-2549, Vector) or Alexa Fluor 555 anti-guinea pig IgG (ab150186, Abcam) for 1 h at room temperature. After 3 washes in PBS-T, coverslips were then mounted on glass slides in Fluoromount-G medium containing DAPI (0100-20, Southern Biotech). Samples were examined under a Leica spectral SP5 confocal microscope equipped with a 63x 1.4-0.6 oil-immersion objective using the LAS-AF software, or using a Zeiss LSM800 confocal microscope equipped with a 63x 1.4 oil immersion objective on the ZEN software.

For LC3 and LAMP-1 assays, HeLa cells were plated in 6-well plates and transfected using DreamFect Gold (OZBiosciences). Twenty-four hours after transfection, cells were transferred on glass coverslips. The next day, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, washed and permeabilized using Triton X100. After saturation in PBS supplemented with 1% BSA, coverslips were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in saturation buffer. After washing, coverslips were incubated for 45 min at 4°C with secondary antibodies diluted in saturation buffer. Coverslips were then mounted on glass slides using Dako Fluorescence mounting medium.

Images were processed with ImageJ [Abràmoff et al., 2004]. Co-localization scores using Mander's overlap coefficient were calculated for individual representative cells using Just Another Co-localization Plugin (JACoP) for ImageJ.

Reporter gene assays HEK293T cells were transfected with the NF- κ B-luciferase or HTLV-1-LTR-luciferase reporter vectors together with the indicated plasmids or siRNA. A Renilla luciferase reporter vector (phRG-TK, Promega) was used as an internal control to normalize for transfection efficiency. Cells were harvested 24 h after transfection and assayed for luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and a Mithras multimode plaque reader luminometer (Berthold).

Statistical analyses Data are presented as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was used to compare means (GraphPad Prism), except for Figure 2.12, containing only two data-set compared using one-tailed paired Student's t-test. Differences between means were considered significant when the p-value was less than 0.05.

1 **HTLV-1 Tax-Induced NF-κB Activation Involves Selective Autophagy**

2 **Receptors at Autophagic Membranes**

3
4 Aurélien Schwob^{1,2}, Pauline Verlhac³, Yakubu Princely Abudu⁴, Janelle Gauthier^{1,2}, Mathias
5 Faure³, Terje Johansen⁴, Renaud Mahieux^{1,2}, Chloé Journo^{1,2*}

6
7 ¹ International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory,
8 INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale
9 Supérieure de Lyon, Université Lyon, F-69007, Lyon, France

10 ² Equipe labellisée “Ligue Nationale Contre le Cancer”

11 ³ International Center for Research in Infectiology, Autophagy, Infection, Immunity
12 Laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École
13 Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, F-69007, Lyon, France.

14 ⁴ Molecular Cancer Research Group, Institute of Medical Biology, University of Tromsø -
15 The Arctic University of Norway, 9037 Tromsø, Norway.

16
17 *Corresponding author

18 Email: chloe.journo@ens-lyon.fr (CJ)

19

19 **Abstract**

20 The NF- κ B signaling pathway, which controls cell survival and proliferation, is constitutively
21 activated in adult T cell leukemia, an aggressive hematological malignancy caused by Human
22 T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1). The viral Tax oncoprotein triggers constitutive NF-
23 κ B activation by interacting with IKK γ . We previously showed that HTLV-1 Tax-dependent
24 activation of NF- κ B requires ubiquitinated Tax interaction with Optineurin (OPTN) and
25 TAX1BP1, which have recently been described as members of the Sequestosome-1 (SQSTM-
26 1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR) family. We thus hypothesized that SLRs could
27 be hijacked by Tax to target the Tax/IKK γ signalosome to autophagic membranes for full
28 signaling efficiency. Using immunoprecipitation and confocal imaging of endogenous p62 in
29 Tax-expressing cells and in HTLV-1 chronically infected T cell lines, we demonstrated that
30 Tax interacts with p62. Unexpectedly, this interaction was a direct, Tax ubiquitination-
31 independent interaction. Reporter assays in *p62*-deficient MEF cells and *p62*-silenced
32 HEK293T cells further showed that p62 is required for efficient Tax signaling activity on NF-
33 κ B. Confocal imaging in GFP-LC3 cells combined with functional assays in *ATG7*-, *ATG5*-
34 and *BECN1*-silenced cells indicated that p62 and OPTN target the IKK γ -containing Tax
35 signalosome to autophagic membranes where NF- κ B signaling is fully activated. Altogether,
36 our results support a role of autophagic scaffolding for Tax-induced NF- κ B activation and
37 suggest an intricate interplay between HTLV-1 and autophagy.

38

38 **Author Summary**

39 The NF- κ B signaling pathway controls cell survival and proliferation and is constitutively
40 activated in most cancers. Recently, selective autophagy, *i.e.* targeting of specific cargoes for
41 autophagic degradation by so-called selective autophagy receptors, has emerged as a key
42 regulator of protein as well as organelle turnover. Intriguingly, selective autophagy receptors
43 belonging to the Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR)
44 family, such as p62 itself, Optineurin (OPTN) and TAX1BP1, are also well-known regulators
45 of the NF- κ B pathway, thus suggesting an intimate cross-regulation of selective autophagy
46 and NF- κ B signaling. Here, we focused on Human T- Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1),
47 which causes the development of a severe hematological disease termed adult T cell
48 leukemia. HTLV-1 Tax protein constitutively activates the NF- κ B pathway and we previously
49 showed that OPTN and TAX1BP1 potentiated this activity. Our aim was to characterize the
50 possible link between HTLV-1-induced NF- κ B activation and selective autophagy. We show
51 that Tax interacts with p62 in a direct and ubiquitin-independent manner, leading to an
52 increased NF- κ B activation. Our data further indicate that Tax-containing NF- κ B activation
53 complexes localize at autophagic membranes and that autophagy is required for efficient Tax-
54 mediated NF- κ B activation. Altogether, our results provide evidence that SLRs are involved
55 in Tax-induced NF- κ B activation.

56

56 **Introduction**

57 Human T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is a member of the *Retroviridae* family and
58 of the *Deltaretrovirus* genus [1,2]. It infects at least 5 to 10 millions people worldwide with
59 several endemic regions such as Japan, Sub-Saharan Africa, the Caribbean and Eastern
60 Europe (for a review, see [3,4]). HTLV-1 is the etiologic agent of a leukemia termed Adult T
61 cell Leukemia (ATL) and of a set of inflammatory diseases including Tropical Spastic
62 Paraparesis / HTLV-Associated Myelopathy (HAM/TSP) (for a review, see [5]). At the
63 cellular level, HTLV-1 induces the constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway in
64 infected T cells, which drives both cell transformation and inflammation [6,7]. The viral
65 transactivator Tax, encoded by the pX region in the 3' portion of HTLV-1 genome, promotes
66 constitutive activation of both the canonical and non-canonical NF- κ B pathways (for a
67 review, see [8]).

68 In non-infected T cells, the canonical NF- κ B pathway is activated downstream of several
69 receptors, such as Toll-Like Receptors (TLR), Tumor Necrosis Factors Receptors (TNFR)
70 and T Cell Receptor (TCR). Regardless of the nature of the receptor, its engagement results in
71 the recruitment of the I κ B kinase (IKK) complex by K63-linked and linear polyubiquitin
72 chains borne by signaling intermediates, such as TRAF6, RIP1 or MALT1, or by unanchored
73 polyubiquitin chains (for a review, see [9]). Activation of the IKK complex then promotes
74 phosphorylation of the I κ B α inhibitor followed by its ubiquitination and proteasomal
75 degradation, allowing NF- κ B nuclear translocation and target gene transactivation. HTLV-1
76 Tax has been shown to recruit the regulatory IKK γ subunit of the IKK complex [10,11] via
77 Tax-conjugated K63-polyubiquitin chains [12–18], leading to I κ B α degradation and NF- κ B
78 activation (for a review, see [19]). A recent study also suggested that Tax could enhance the
79 synthesis of unanchored polyubiquitin chains by RNF8, which could in turn trigger IKK

80 activation [20]. On the other hand, Tax was also suggested to act as an E3-ubiquitin ligase
81 that directly catalyzes the synthesis of unanchored polyubiquitin chains [21].
82 The Tax/IKK γ signalosome has been described as a cytoplasmic, centrosome and Golgi-
83 associated complex [13,17,18] that assembles mainly on lipid rafts [22]. In a previous work,
84 we identified both Optineurin (OPTN) and Tax1-Binding Protein1 (TAX1BP1) as crucial
85 cellular partners involved in Tax-dependent NF- κ B activation [23]. More specifically, OPTN
86 was shown to interact with Tax in Golgi-associated structures and to enhance its K63-
87 polyubiquitination in a TAX1BP1-dependent manner. OPTN and TAX1BP1 association with
88 the Tax/IKK γ signalosome on lipid raft-enriched membranes was further confirmed by others
89 using density gradient ultracentrifugation of infected cell lysates [24]. Independently,
90 Shembade *et al.* demonstrated that Tax interaction with TAX1BP1 impaired the assembly of
91 the inhibitory TAX1BP1/A20 complex, further contributing to constitutive NF- κ B activation
92 [25].
93 Interestingly, both OPTN and TAX1BP1 have recently been identified as members of the
94 Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR) family [26,27] (for
95 a review, see [28]), which function as selective macroautophagy receptors (reviewed in [29]).
96 Selective macroautophagy (hereafter referred to as selective autophagy) is a lysosomal
97 degradation pathway that specifically targets given cargoes to autophagosomes. These targets
98 might be bacteria (xenophagy), cell organelles (for instance mitophagy), but also selected
99 proteins. Selective autophagy is thus central to cell homeostasis. At the molecular level,
100 selective autophagy relies on the recruitment of Microtubule-Associated Protein 1 Light
101 Chain 3 (MAP-LC3, referred to as LC3) at the phagophore membrane, followed by LC3-
102 dependent recruitment of selective autophagy receptors bound to their cargo [30,31].
103 In addition to its function as a selective autophagic receptor, p62 has also been shown to

104 potentiate NF- κ B signaling downstream of TNF α and IL-1 stimulation by interacting with
105 PKC ζ , RIP1, TRAF6 and IKK γ and enhancing TRAF6 E3 ubiquitin ligase activity towards
106 TRAF6 itself and towards IKK γ [32–34] (for a review, see [35]). p62 was further shown to
107 interact with MEKK3 and to allow MEKK3 association with TRAF6, thereby allowing
108 MEKK3-induced activation of NF- κ B [36]. p62 also potentiates TRAF6-dependent NF- κ B
109 signaling downstream of CD40 activation in macrophages [37]. Upon TCR stimulation in T
110 cells, p62 was identified as an essential scaffold that mediates the clustering of the MALT1-
111 BCL10-TRAF6 signalosome upstream of IKK activation [38]. Taken together, these findings
112 suggest a crucial scaffolding hub function for p62 in the NF- κ B signaling pathway. Besides,
113 the concept that autophagic membranes can act as scaffolding platforms for assembly of
114 signaling complexes has recently emerged from studies of caspase-8 activation in the extrinsic
115 pathway of apoptosis [39]. Based on these observations, we reasoned that selective autophagy
116 receptors of the SLR family, and in particular p62, could be hijacked by Tax for full NF- κ B
117 signaling efficiency, possibly by targeting the Tax/IKK γ signalosome to autophagic
118 membranes. Herein, we demonstrate that Tax directly binds to p62 in an ubiquitin-
119 independent manner and that p62 associates with the Tax/IKK γ signalosome. We further
120 demonstrate that Tax/p62 complexes are located at autophagic membranes and that the
121 autophagic machinery is critical for optimal Tax-induced NF- κ B signaling. Altogether, our
122 results indicate that Tax may hijack the functions of selective autophagy receptors to recruit
123 its IKK γ signalosome at autophagic membranes for full activation of the NF- κ B pathway.

124

124 **Results**

125 **Tax interacts with p62 in peri-Golgi cytoplasmic structures**

126 We first assessed the subcellular distribution of Tax and endogenous p62 proteins in HeLa
127 cells. Confocal immunofluorescence microscopy indicated that Tax exhibits both nuclear and
128 cytosolic localization, as previously described [13–15,17,18,40]. A number of Tax-positive
129 cytosolic speckles were observed, among which some displayed a strong co-localization with
130 endogenous p62 (Fig 1A, see the intensity profile on the right; Mander's coefficient (Tax/p62)
131 = 0.66; Mander's coefficient (p62/Tax) = 0.9). This co-localization was confirmed in HTLV-1
132 chronically-infected C8166 T cells that express Tax but that do not produce any viral particles
133 [41] (Fig 1B; Mander's coefficient (Tax/p62) = 0.55; Mander's coefficient (p62/Tax) = 0.71).
134 Because we previously demonstrated that Tax co-localizes with OPTN, another SLR member,
135 in Golgi-associated structures [23], we then determined the subcellular localization of
136 Tax/p62 structures. Interestingly, confocal analyses showed that in contrast to Tax/OPTN,
137 Tax/p62 speckles did not overlay the GM130 staining in HeLa cells, but distributed at the
138 periphery of the Golgi compartment with only partial co-localization (Fig 1C).
139 In order to test the hypothesis of an interaction between Tax and p62, co-immunoprecipitation
140 assays were then performed. In Tax-expressing HeLa cells, Tax was detected after
141 endogenous p62 immunoprecipitation, but not after control IgG immunoprecipitation (Fig 1D,
142 lane 2 vs. 4), indicating that Tax specifically interacts with endogenous p62. Tax and p62 co-
143 immunoprecipitation was also observed in HTLV-1 chronically-infected C8166 cells (Fig 1E,
144 lane 2). Taken together, these results support the conclusion that p62 and Tax associate in
145 peri-Golgi structures.

146

147 **p62 directly interacts with Tax in an ubiquitin-independent manner**

148 As an autophagic receptor, p62 is described to interact with several cargoes through its
149 ubiquitin-binding UBA (ubiquitin-associated) domain ([42], reviewed in [43]). Tax harbors
150 10 lysine residues and ubiquitination on lysine 4 to 8 is required for interaction with OPTN
151 and activation of the NF- κ B pathway [12–14,17,18,23]. We thus hypothesized that Tax
152 interaction with p62 would also depend on Tax ubiquitination. Unexpectedly, ubiquitination-
153 defective Tax mutants (Tax-K4-8R, mutated on lysine 4 to 8, and Tax-K0, mutated on all 10
154 lysine residues) co-immunoprecipitated with endogenous p62 as efficiently as wild type Tax
155 (Fig 2A, lanes 1 to 3), indicating that Tax ubiquitination is not required for interaction with
156 p62. As a control, the antisense protein of HTLV-1 (HBZ) did not immunoprecipitate with
157 p62, indicating that the Tax/p62 interaction is specific (lane 4). To further confirm that Tax
158 interaction with p62 does not require Tax ubiquitination, co-immunoprecipitation assays were
159 performed using a p62 construct in which the ubiquitin-binding domain is deleted
160 (p62 Δ UBA). Because p62 is known to polymerize, and in order to avoid rescue of mutant p62
161 function by polymerization with wild type p62, the experiment was conducted in *p62*
162 knockout (*p62*^{-/-}) MEF cells (Fig 2B). Consistent with Fig 2A, p62 Δ UBA interacted with Tax
163 as efficiently as full-length p62 (p62^{FL}, Fig 2B, compare lanes 1 and 4), confirming that the
164 Tax/p62 interaction does not depend upon Tax ubiquitination. We then tested whether Tax
165 directly interacts with p62 and if so, which domain of p62 is required for the interaction. *In*
166 *vitro* GST-pulldown assays were performed using GST-p62 and *in vitro* translated ³⁵S-labeled
167 Tax. This resulted in Tax detection after GST-p62 pulldown (Fig 2C), indicating that Tax and
168 p62 directly interact. Repeating the experiment with the GST-tagged deletion mutants of p62
169 shown in Fig 2D, further showed that the GST-p62 Δ 170-256 mutant alone was unable to pull-
170 down *in vitro* translated Tax, indicating that the 170-256 region of p62 is required for
171 interaction with Tax (Fig 2E). Refining the mapping of the interacting region in p62 using

172 MBP-tagged deletion constructs of p62 demonstrated that the region 170-221 encompassing
173 the Multiple protein Interaction Region (MIR) is required for binding of Tax (Fig 2F). In fact,
174 a fragment containing amino acids 170-206 of p62 fused to MBP was sufficient for binding
175 Tax (Fig 2F). Taken together, these results indicate that contrary to OPTN, Tax directly
176 interacts with p62 in an ubiquitination-independent manner.

177

178 **p62 potentiates Tax-dependent NF- κ B activation**

179 OPTN and TAX1BP1 potentiate Tax-dependent NF- κ B activation [23]. We therefore
180 assessed whether p62 also modulates Tax-induced NF- κ B signaling. Upon Tax expression, a
181 dose-dependent activation of the NF- κ B-dependent reporter was observed in wild type MEF
182 cells (Fig 3A). Interestingly, Tax-dependent NF- κ B activation was significantly lower in *p62*-
183 *-/-* MEF cells compared to wild type cells, reaching only 50% of maximal activation, thus
184 indicating that p62 is necessary for optimal activation of NF- κ B by Tax. To verify that p62
185 was specifically involved in Tax-mediated NF- κ B activation and not in other functions of Tax
186 such as HTLV-1 LTR transactivation, we repeated the experiment using a LTR-dependent
187 reporter. *p62* knock-out did not significantly affect Tax-dependent HTLV-1 LTR activation,
188 thus demonstrating an NF- κ B-specific interplay between p62 and Tax (Fig 3B). Importantly,
189 the impact of p62 on Tax-dependent NF- κ B activation was not due to a modulation of Tax
190 expression, since western blot analysis of cell lysates revealed that *p62* knockout did not
191 affect Tax expression (Fig 3C, compare lanes 2-4 and 6-8).

192 Potentiation of Tax-induced NF- κ B activation by p62 was further confirmed in human cells in
193 which *p62* expression was silenced by RNA interference (Fig 3D), whereas no significant
194 difference was observed for HTLV-1 LTR activation (Fig 3E). As controls, p62 and Tax
195 western blots were performed and confirmed both p62 knockdown and the stability of Tax

196 expression levels upon p62 silencing (Fig 3F).

197 Altogether, these results demonstrate that p62 is required for optimal Tax-dependent NF- κ B
198 activation. This effect is specific for NF- κ B activation, as p62 is dispensable for HTLV-1
199 LTR activation.

200

201 **p62 is associated with the Tax/IKK γ signalosome**

202 Because p62 is known to mediate scaffolding of signaling complexes, we then hypothesized
203 that p62 could be associated with the Tax/IKK γ signalosome. To investigate whether p62 co-
204 localized with the Tax/IKK γ signalosome, confocal microscopy analyses were performed.
205 Consistent with previous reports, Tax induced massive IKK γ relocalization in perinuclear
206 structures (Fig 4A, compare Tax-positive and Tax-negative cells). Some of these structures
207 were also p62-positive (Fig 4A, see the intensity profiles). Tax-negative cells exhibited a
208 diffuse distribution of IKK γ with no co-localization between IKK γ and p62, strongly
209 suggesting that Tax mediates the association between p62 and IKK γ . We next determined
210 whether expression of Tax allows endogenous p62 to interact with IKK γ , and found that
211 endogenous IKK γ co-precipitated with p62 in Tax-transfected cells but not in mock-
212 transfected cells (Fig 4B upper panel, compare lane 1 and 2), indicating that Tax mediated the
213 association between p62 and IKK γ . These data also confirmed that Tax co-
214 immunoprecipitated with endogenous p62 (Fig 4B second panel, lane 2). Finally, to formally
215 determine whether p62 is present in the Tax/IKK γ signalosome, cells were transiently
216 transfected with FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and the Tax/IKK γ
217 signalosome was purified by FLAG-specific immunoprecipitation followed by His-selective
218 Ni-NTA purification (Fig 4C). FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax-expressing cells
219 analyzed by this two-step protocol showed that p62 co-purified with Tax and IKK γ ,

220 demonstrating that p62 is indeed associated with the Tax/IKK γ signalosome.
221 To determine whether p62 is required for assembly of the Tax/IKK γ signalosome or whether
222 it interacts with pre-formed Tax/IKK γ complexes, Tax/IKK γ co-immunoprecipitation was
223 performed in wild type and *p62*^{-/-} MEFs (Fig 4D). Cells were transiently transfected with
224 FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and cell lysates were submitted to anti-
225 FLAG immunoprecipitation. Tax and IKK γ interacted equally efficiently in wild type and
226 *p62*^{-/-} cells (Fig 4D, compare lanes 1 and 4), indicating that p62 is not required for the
227 assembly of the Tax/IKK γ signalosome. These data thus strongly suggest that p62 interacts
228 with pre-formed Tax/IKK γ complexes.

229

230 **Tax/p62 structures are associated with autophagic membranes**

231 Because p62 is known to function as a selective autophagy receptor that allows the
232 recruitment of cargoes to autophagosomal membranes [29,44], and because the Tax/IKK γ
233 signalosome is known to associate with cellular membranes [22], we hypothesized that p62
234 might target the Tax/IKK γ signalosome to autophagic membranes. This hypothesis was tested
235 in HeLa cells stably expressing GFP-LC3, a widely accepted marker of autophagic
236 membranes [45], and transiently expressing Tax (Fig 5A). Comparison of Tax, p62 and LC3
237 subcellular distribution showed that foci of Tax/p62 co-localization were consistently GFP-
238 positive (see the representative intensity plot on the right), indicating that Tax and p62 co-
239 localize in LC3-containing structures. Once formed, autophagosomes can mature into
240 autolysosomes by fusion with lysosomes. To determine whether the LC3-positive
241 compartments where Tax and p62 co-localize are signaling compartments or degradative
242 compartments, Tax-expressing HeLa cells were stained with LAMP-1, a lysosomal marker
243 (Fig 5B). Foci of Tax/p62/LAMP-1-positive structures were not found (see the representative

244 intensity plot on the right), indicating that Tax and p62 co-localize in LC3-containing
245 structures that seem not to be connected to lysosomes. Taken together, these results suggest
246 that p62 may target the Tax/IKK γ signalosome at non-degradative autophagic membranes that
247 would not mature into autolysosomes.

248 Tax interacts with OPTN [23]. To determine whether Tax/OPTN structures could also be
249 located at autophagic membranes, similar confocal analyses were performed in GFP-LC3
250 HeLa cells (Fig 5C). Comparison of Tax, OPTN and LC3 subcellular distribution showed that
251 some but not all Tax/OPTN structures were also GFP-positive, indicating that in contrast to
252 Tax/p62, only a fraction of Tax/OPTN complexes are located at LC3-positive structures.

253

254 **Formation of autophagy membranes is required for efficient Tax-induced NF- κ B** 255 **signaling**

256 We then investigated whether the targeting of Tax/IKK γ signalosome to autophagic
257 membranes was required for Tax-induced NF- κ B activation. ATG7, ATG5 and Beclin1 are
258 key regulators of autophagosome formation. We therefore compared Tax-induced NF- κ B
259 activation in control and *ATG7*-, *ATG5*- or *BECN1*-silenced cells (Fig 6A), in which
260 autophagosome formation is impaired [45]. In order to normalize for the possible effect of
261 *ATG7*, *ATG5* or *BECN1* silencing on basal NF- κ B activation [46], Tax-induced NF- κ B
262 activation was calculated as a fold-induction over empty vector-transfected cells, and set to 1
263 for cells transfected with control siRNA. Silencing of *ATG7*, *ATG5* or *BECN1* resulted in a
264 significant decrease in Tax-dependent NF- κ B activation (the mean decrease ranging from
265 40% for *ATG7* to 18% for *BECN1* silencing), demonstrating that a functional autophagic
266 pathway is required for full activation of the NF- κ B pathway by Tax. As controls, *ATG7*,
267 *ATG5* and *BECN1* silencing as well as Tax-His expression were assessed by western blot.

268 Because we showed above that p62 potentiated Tax-induced NF- κ B activation and that
269 Tax/p62 complexes were associated with LC3-positive structures, we then tested whether
270 formation of autophagic membranes was required for p62-mediated potentiation of Tax-
271 dependent NF- κ B activation. To do so, we compared ectopic p62-mediated potentiation of
272 Tax activity in control versus *ATG7*-silenced cells (Fig 6B). Here, we determined the specific
273 action of p62 on Tax-dependent NF- κ B activation by calculating the fold-induction over the
274 corresponding endogenous p62 condition. Ectopic expression of low levels of p62 led to a
275 25% increase in Tax activity in control cells. However, this effect was not observed in *ATG7*-
276 silenced cells, where p62 over-expression led to a 25% decrease in Tax activity, indicating
277 that formation of autophagic membranes is indeed required for efficient p62-mediated
278 potentiation of Tax activity on NF- κ B. *ATG7* silencing as well as ectopic p62 expression were
279 confirmed by western blot.

280 To determine whether formation of autophagic membranes was also required for OPTN-
281 mediated potentiation of Tax-dependent NF- κ B activation, we finally compared OPTN-
282 mediated potentiation of Tax activity in control versus *ATG7*-silenced cells (Fig 6C). Again,
283 ectopic expression of low levels of OPTN led to a 20% increase in Tax activity in control
284 cells, whereas this effect was not observed in *ATG7*-silenced cells. *ATG7* silencing as well as
285 ectopic OPTN expression were confirmed by western blot.

286 Taken together, these results support a model where p62 and OPTN enhance the efficiency of
287 Tax-induced NF- κ B signaling at non-degradative autophagic membranes.

288

288 **Discussion**

289 Since the description of IKK γ as a central target of Tax upon NF- κ B activation [10,11],
290 several additional partners required for efficient signaling have been characterized, including
291 OPTN and TAX1BP1 [23]. The recent description of both OPTN and TAX1BP1 as members
292 of the Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR) family and
293 the well-described involvement of p62 in NF- κ B regulation prompted us to hypothesize a
294 hijacking of p62 functions as a SLR for full signaling efficiency. Our results indicate that Tax
295 indeed interacts with p62, although independently of Tax ubiquitination, which is distinct
296 from Tax interaction with OPTN and TAX1BP1. We further show that similar to OPTN and
297 TAX1BP1, p62 is required for full Tax-induced NF- κ B signaling. We show that p62 interacts
298 with the Tax/IKK γ signalosome and that Tax/p62 structures are consistently localized at non-
299 degradative LC3-positive autophagic membranes. We therefore propose a model in which
300 autophagic membranes may serve as signaling platforms onto which the Tax/IKK γ
301 signalosome is targeted for efficient maintenance of the NF- κ B signaling pathway (Fig 7).
302 The region of p62 that engages Tax by direct interaction (amino acids 170 to 220) is denoted
303 MIR because several proteins are known to bind p62 through this domain, including the LIM
304 domain protein Ajuba [47], p38 MAPK [48], a familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
305 mutant of superoxide dismutase (SOD1) [49] and the autophagy adapter ALFY [50]. Hence,
306 this region functions as an important protein-protein interaction domain. This direct
307 interaction is in marked contrast with Tax/IKK γ and Tax/OPTN interactions for which Tax
308 ubiquitination is essential [23]. Interestingly, p62 has been described to interact with two
309 other viral proteins independently of ubiquitination, the capsid protein of Sindbis virus [51]
310 and the Tat transactivator of human immunodeficiency virus type 1 [52]. However, and in
311 contrast to our work, no direct interaction between p62 and the viral proteins were described,

312 indicating that Tax is the first direct, ubiquitin-independent viral partner of p62 to be reported.
313 p62 is a multi-functional scaffold protein regulating NF- κ B activation downstream of TNFR,
314 IL1R, CD40 and TCR (reviewed in [35]). Recent work by Paul *et al.* showed that p62
315 scaffolds the MALT1-BCL10-TRAF6-IKK signalosome in so-called cytosolic POLKADOTS
316 (punctate and oligomeric killing or activating domains transducing signals) downstream of
317 TCR activation in T cells [38]. Of note, these POLKADOTS are associated with autophagic
318 structures involved in the degradation of BCL10 and termination of signaling [53]. In our
319 study, assessment of Tax/p62 localization in GFP-LC3-expressing cells showed that these
320 complexes are consistently localized at LC3-positive structures, suggesting that Tax may
321 hijack p62 functions to mimic the TCR-driven assembly of the NF- κ B signalosome at
322 autophagic membranes. Of note, in the context of Tax expression, these autophagic
323 compartments are non-degradative as there is no Tax/p62 co-localization with LAMP-1. This
324 is in agreement with the fact that although Tax has been suggested to be a target of autophagic
325 degradation, it was also shown to inhibit autophagic degradation in infected cells through
326 inhibition of the fusion between autophagosomes and lysosomes [54]. Our data confirm that
327 at the steady-state, Tax escapes autophagic degradation and thus may hijack autophagic
328 membranes for signaling.

329 Our data support a two-step process (Fig 7): (i) assembly of the Tax/IKK γ signalosome on
330 Golgi membranes [13,17,22] and (ii) recruitment of this pre-formed complex by p62 onto
331 autophagic membranes. While the endoplasmic reticulum (ER) appears as the main origin for
332 autophagosomal membranes (for a review, see [55]), recent data describe the ER-Golgi
333 intermediate compartment (ERGIC), a recycling station between the ER and the Golgi
334 apparatus, as a novel source for autophagosome biogenesis [56]. This opens new perspectives
335 in the spatio-temporal dynamics of Tax interplay with cytoplasmic membranes, suggesting

336 that membranes onto which the Tax/IKK γ signalosome assembles could evolve in time from
337 Golgi- or ERGIC-associated structures to autophagic membranes. Alternatively, the
338 Tax/IKK γ signalosome could be transferred from Golgi to autophagic membranes by a
339 mechanism that could involve SLRs. Consistent with our observations, Ren *et al.* recently
340 reported that Tax directed the recruitment of the autophagy initiators Beclin1 and Bif-1 to
341 lipid raft domains, thus inducing formation of autophagosomes in an IKK-dependent manner
342 [57]. Interplays between Beclin1, Bif-1 and SLRs in this process need to be further
343 investigated.

344 The detailed molecular mechanism underlying p62 and autophagy-mediated potentiation of
345 Tax signaling activity on NF- κ B remains unclear. Although TRAF6 was initially described as
346 dispensable for Tax-induced NF- κ B activation [58], Tax has since then been demonstrated to
347 interact with TRAF6 and promote TRAF6 self-ubiquitination in an IKK γ -dependent manner,
348 a process that was proposed to play a role in Tax-induced NF- κ B activation [59,60]. Whether
349 Tax exploits p62 ability to increase TRAF6 self-ubiquitination for efficient NF- κ B signaling
350 [33] remains to be investigated. Alternatively, because Tax enhances the synthesis of
351 unanchored polyubiquitin chains [20,21], we hypothesize that p62 could interact with
352 unanchored polyubiquitin chains produced upon Tax expression and retain them in close
353 proximity to the Tax/IKK γ signalosome for full activation. Displacement of Tax/IKK γ
354 signalosome to sites distinct from the Golgi apparatus could also help it to escape negative
355 regulatory mechanisms such as editing of polyubiquitin chains by the A20/Itch complex [25]
356 or de-ubiquitination by CYLD or USP20 [59,61,62], although this needs to be tested
357 experimentally.

358 Consistent with our observation that the autophagic machinery is required for full NF- κ B
359 activation by Tax, Beclin1 and ATG5 were recently shown to maintain NF- κ B signaling in

360 HTLV-1-infected cells [63]. Autophagosomal membranes have been demonstrated to function
361 as signaling platforms for the assembly of caspase-8 complexes upon extrinsic apoptosis
362 induction [39]. It was hypothesized that p62 may facilitate self-association of caspase-8,
363 followed by its recruitment and activation at autophagosomal membranes [64,65].
364 Autophagosomal membranes were suggested to allow high order oligomerization of caspase-
365 8, which is critical for its activation. Of note, it has been suggested that Tax-induced IKK
366 activation was mediated, at least in part, by IKK γ oligomerization [66,67]. Our results raise
367 the hypothesis that autophagic recruitment could enhance oligomerization of IKK γ , possibly
368 by taking advantage of the ability of p62 to form large, filamentous assemblies on
369 autophagosomal membranes [68].
370 Taken together, our results support the emerging notion that the autophagy-related machinery
371 can be involved in processes such as membrane reorganization, intra-cellular trafficking and
372 signaling that are distinct from *bona fide* autophagy, *i.e.* that are not related to degradation
373 and/or recycling of intracellular constituents (reviewed in [69]). Our data further indicate that
374 in addition to interfering with *bona fide* autophagy, viruses have also evolved strategies to
375 hijack these non-conventional functions of the autophagy-related machinery.
376

493 **Acknowledgments**

494 We would like to thank Dr. J-M. Mesnard, Dr. A-S. Nicot, Pr. L. Schaeffer, Dr. J. Moscat, Dr.
495 T. Yanagawa, Dr. Antoine Gessain and Dr. V. Mocquet for their kindly gifts of plasmids,
496 cells, reagents and crucial technical advice. We thank the Retroviral Oncogenesis team and in
497 particular Dr. H. Dutartre, as well as Dr. P. Afonso and Dr. B. Py for helpful discussion. We
498 also thank the PLATIM microscopy facility of the Lyon SFR Biosciences for its help with
499 image acquisition, image analysis and everyday technical support.

500

501 **References**

- 502 1. Poiesz B, Ruscetti F, Gazdar A, Bunn P, Minna J, Gallo RC. Detection and isolation of
503 type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with
504 cutaneous T-cell lymphoma. PNAS. 1980;77(12):7415–9.
- 505 2. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell
506 lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. PNAS.
507 1982;79(6):2031–5.
- 508 3. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1
509 Infection. Front Microbiol. 2012;3:388.
- 510 4. Willems L, Hasegawa H, Accolla R, Bangham C, Bazarbachi A, Bertazzoni U, et al.
511 Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action.
512 Antiviral Res. 2017;137:41–8.
- 513 5. Satou Y, Matsuoka M. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis
514 of human T-cell leukemia virus type 1. Rev Med Virol. 2013;23:269–80.
- 515 6. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, et al. Constitutive
516 activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. Blood. 1999;93(7):2360–8.

- 517 7. Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, et al. Rapid
518 Tumor Formation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cell Lines in
519 Novel NOD-SCID / γ Cnull Mice : Suppression by an Inhibitor against NF- κ B. *J Virol.*
520 2003;77(9):5286–94.
- 521 8. Kfoury Y, Nasr R, Journo C, Mahieux R, Pique C, Bazarbachi A. The multifaceted
522 oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- κ B
523 activation. *Adv Cancer Res.* 2012;113:85–120.
- 524 9. Chen J, Chen ZJ. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr Opin Immunol.*
525 2013;25(1):4–12.
- 526 10. Chu Z-L, Shin Y-A, Yang J-M, DiDonato JA, Ballard and DW. IKK Mediates the
527 Interaction of Cellular I κ B Kinases with the Tax Transforming Protein of Human T
528 Cell Leukemia Virus Type 1. *J Biol Chem.* 1999;274:15297–300.
- 529 11. Harhaj EW, Sun S-C. IKK Serves as a Docking Subunit of the I κ B Kinase (IKK) and
530 Mediates Interaction of IKK with the Human T-cell Leukemia Virus Tax Protein. *J*
531 *Biol Chem.* 1999;274:22911–4.
- 532 12. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Pique C. Stable Ubiquitination of Human T-Cell
533 Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *J Virol.*
534 2004;78(21):11823–32.
- 535 13. Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Burny A, Gaynor RB, Brasseur R. Exclusive
536 Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF- κ B
537 Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Mol Cell Biol.*
538 2005;25(23):10391–406.
- 539 14. Nasr R, Chiari E, El-sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, et al. Tax
540 ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B

- 541 activation. *Blood*. 2006;107(10):4021–30.
- 542 15. Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, Turpin J, Vintera J, Côté E, et al. Human T cell
543 leukemia virus type 2 tax-mediated NF- κ B activation involves a mechanism
544 independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J Virol*. 2013;87(2):1123–36.
- 545 16. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. The human T-cell
546 leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme
547 Ubc13 for NF- κ B activation. *J Virol*. 2007;81(24):13735–42.
- 548 17. Harhaj NS, Sun S, Harhaj EW. Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia
549 Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization
550 of I κ B Kinase. *J Biol Chem*. 2007;282(6):4185–92.
- 551 18. Kfoury Y, Nasr R, Favre-Bonvin A, El-Sabban M, Renault N, Giron M-L, et al.
552 Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome.
553 *Oncogene*. 2008;27(12):1665–76.
- 554 19. Lavorgna A, Harhaj EW. Regulation of HTLV-1 Tax Stability, Cellular Trafficking
555 and NF- κ B Activation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Viruses*. 2014;6:3925–
556 43.
- 557 20. Ho Y-K, Zhi H, Bowlin T, Dorjbal B, Philip S, Zahoor MA, et al. HTLV-1 Tax
558 Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked
559 Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation. *PLoS Pathog*.
560 2015;11(8):e1005102.
- 561 21. Wang C, Long W, Peng C, Hu L, Zhang Q, Wu A, et al. HTLV-1 Tax Functions as a
562 Ubiquitin E3 Ligase for Direct IKK Activation via Synthesis of Mixed-Linkage
563 Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):1–25.
- 564 22. Huang J, Ren T, Guan H, Jiang Y, Cheng H. HTLV-1 Tax is a critical lipid raft

- 565 modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF-
566 κ B. *J Biol Chem.* 2009;284(10):6208–17.
- 567 23. Journo C, Filipe J, About F, Chevalier SA, Afonso P V, Brady JN, et al.
568 NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- κ B by
569 human T-lymphotropic virus type 1 Tax protein. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):e1000521.
- 570 24. Pujari R, Hunte R, Thomas R, van der Weyden L, Rauch D, Ratner L, et al. Human T-
571 Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Requires CADM1/TSLC1 for Inactivation
572 of the NF- κ B Inhibitor A20 and Constitutive NF- κ B Signaling. *PLoS Pathog.*
573 2015;11(3):e1004721.
- 574 25. Shembade N, Pujari R, Harhaj NS, Abbott DW, Harhaj EW. The kinase IKK α inhibits
575 activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory
576 molecule TAX1BP1. *Nat Immunol.* 2011;12(9):834–44.
- 577 26. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov V V, Brady NR, et al.
578 Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth.
579 *Science.* 2011;333(6039):228–33.
- 580 27. Tumbarello DA, Manna PT, Allen M, Bycroft M, Arden SD, Kendrick-Jones J, et al.
581 The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are
582 Required for Clearance of *Salmonella* Typhimurium by Autophagy. *PLoS Pathog.*
583 2015;11(10):e1005174.
- 584 28. Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and
585 repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(1):21–31.
- 586 29. Svenning S, Johansen T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* 2013;55(1):79–92.
- 587 30. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins.
588 *Autophagy.* 2011;7(3):279–96.

- 589 31. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between Autophagy Receptors
590 and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Mol*
591 *Cell*. 2014;53(2):167–78.
- 592 32. Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. The atypical PKC-interacting protein
593 p62 channels NF- κ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J*.
594 2000;19(7):1576–86.
- 595 33. Wooten MW, Geetha T, Seibenhener ML, Babu JR, Diaz-Meco MT, Moscat J. The
596 p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF- κ B activation by influencing
597 TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35625–9.
- 598 34. Zotti T, Scudiero I, Settembre P, Ferravante A, Mazzone P, D’Andrea L, et al. TRAF6-
599 mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Mol Immunol*.
600 2014;58(1):27–31.
- 601 35. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and diversification through
602 the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(2):95–100.
- 603 36. Nakamura K, Kimple AJ, Siderovski DP, Johnson GL. PB1 domain interaction of
604 p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF- κ B activation. *J Biol Chem*.
605 2010;285(3):2077–89.
- 606 37. Seibold K, Ehrenschwender M. p62 regulates CD40-mediated NF- κ B activation in
607 macrophages through interaction with TRAF6. *Biochem Biophys Res Commun*.
608 2015;464(1):330–5.
- 609 38. Paul S, Traver MK, Kashyap AK, Washington M a, Latoche R, May BCS, et al. T Cell
610 Receptor Signals to NF- κ B Are Transmitted by a Cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK
611 Signalosome. *Sci Signal*. 2014;7(325):ra45.
- 612 39. Young MM, Yoshinori T, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, et al. Autophagosomal

- 613 Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex
614 (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *J Biol Chem.*
615 2012;287(15):12455-68.
- 616 40. Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, Mahieux R. A 10-amino acid domain
617 within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 Tax protein sequences is
618 responsible for their divergent subcellular distribution. *J Biol Chem.* 2004;279:43307–
619 20.
- 620 41. Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA. Trans-Acting Transcriptional Activation of the
621 Long Terminal Repeat of Human T Lymphotropic Viruses in Infected Cells. *Science.*
622 1984;225(4660):381–5.
- 623 42. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al.
624 p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective
625 effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005;171(4):603–14.
- 626 43. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In
627 Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 2016;26(1):6–16.
- 628 44. Pankiv S, Lamark T, Brech A, Bruun J, Outzen H, Johansen T. p62/SQSTM1 Binds
629 Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by
630 Autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24131–45.
- 631 45. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin J, Abeliovich H, Arozena AA, et al.
632 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd
633 edition). *Autophagy.* 2015;12(1):1–222.
- 634 46. Criollo A, Chereau F, Malik SA, Niso-Santano M, Mariño G, Galluzzi L, et al.
635 Autophagy is required for the activation of NF- κ B. *Cell Cycle.* 2012;11(1):194–9.
- 636 47. Feng Y, Longmore GD. The LIM Protein Ajuba Influences Interleukin-1-Induced NF-

- 637 κ B Activation by Affecting the Assembly and Activity of the Protein Kinase
638 C/p62/TRAF6 Signaling Complex. *Mol Cell Biol.* 2005;25(10):4010–22.
- 639 48. Kawai K, Saito A, Sudo T, Osada H. Specific Regulation of Cytokine-Dependent p38
640 MAP Kinase Activation by p62/SQSTM1. *J Biochem.* 2008;772(143):765–72.
- 641 49. Gal J, Ström A-L, Kwinter DM, Kilty R, Zhang J, Shi P, et al. Sequestosome 1/p62
642 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J*
643 *Neurochem.* 2009;(111):1062–73.
- 644 50. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley KD, Larsen KB, Brech A, et al.
645 p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and
646 their degradation by autophagy. *Autophagy.* 2010;6(3):330–44.
- 647 51. Orvedahl A, MacPherson S, Jr. RS, Talloczy Z, Zou Z, Levine B. Autophagy Protects
648 against Sindbis Virus Infection of the Central Nervous System. *Cell Host Microbe.*
649 2010;7(1):115–27.
- 650 52. Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, et al. Autophagy
651 Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes. *J*
652 *Virology.* 2015;89(1):615–25.
- 653 53. Paul S, Kashyap AK, Jia W, He YW, Schaefer BC. Selective Autophagy of the
654 Adaptor Protein Bcl10 Modulates T Cell Receptor Activation of NF- κ B. *Immunity.*
655 2012;36(6):947–58.
- 656 54. Tang S-W, Chen C-Y, Klase Z, Zane L, Jeang K-T. The cellular autophagy pathway
657 modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication. *J Virol.* 2013;87(3):1699–
658 707.
- 659 55. Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell*
660 *Res.* 2014;24(1):58–68.

- 661 56. Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R. The ER–Golgi intermediate compartment is
662 a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife*.
663 2013;2:e00947.
- 664 57. Ren T, Takahashi Y, Liu X, Loughran TP, Sun S-C, Wang H-G, et al. HTLV-1 Tax
665 deregulates autophagy by recruiting autophagic molecules into lipid raft microdomains.
666 *Oncogene*. 2015;34:373–84.
- 667 58. Geleziunas R, Ferrell S, Lin X, Mu Y, Cunningham Jr. ET, Grant M, et al. Human T-
668 cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF- κ B involves activation of the I κ B
669 kinase α (IKK α) and IKK β cellular kinases. *Mol Cell Biol*. 1998;18(9):5157–65.
- 670 59. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6
671 and human T cell leukemia virus type 1 Tax to negatively regulate NF- κ B signaling. *J*
672 *Virology*. 2011;85(13):6212–9.
- 673 60. Choi YB, Harhaj EW. HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-
674 Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation. *PLoS Pathog*.
675 2014;10(10):e1004458.
- 676 61. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Gilles C. The
677 tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination.
678 *Nature*. 2003;424(6950):801–5.
- 679 62. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G.
680 CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by
681 TNFR family members. *Nature*. 2003;424(6950):793–6.
- 682 63. Chen L, Liu D, Zhang Y, Zhang H, Cheng H. The autophagy molecule Beclin 1
683 maintains persistent activity of NF- κ B and Stat3 in HTLV-1-transformed T
684 lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;4:1–7.

- 685 64. Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs K a, et al. FADD
686 and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. Proc
687 Natl Acad Sci U S A. 2008;105(43):16677–82.
- 688 65. Laussmann MA, Passante E, Düssmann H, Rauen JA, Würstle ML, Delgado ME, et al.
689 Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-
690 8. Cell Death Differ. 2011;18(10):1584–97.
- 691 66. Huang GJ, Zhang ZQ, Jin DY. Stimulation of IKK γ oligomerization by the human T-
692 cell leukemia virus oncoprotein Tax. FEBS Lett. 2002;531(3):494–8.
- 693 67. Fontan E, Traincard F, Levy SG, Yamaoka S, Véron M, Agou F. NEMO
694 oligomerization in the dynamic assembly of the I κ B kinase core complex. FEBS J.
695 2007;274(10):2540–51.
- 696 68. Ciuffa R, Lamark T, Tarafder AK, Guesdon A, Rybina S, Hagen WJH, et al. The
697 Selective Autophagy Receptor p62 Forms a Flexible Filamentous Helical Scaffold.
698 Cell Rep. 2015;11(5):748–58.
- 699 69. Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. EMBO
700 Rep. 2013;14(2):143–51.
- 701 70. Thébault S, Basbous J, Hivin P, Devaux C, Mesnard JM. HBZ interacts with JunD and
702 stimulates its transcriptional activity. FEBS Lett. 2004;562(1–3):165–70.
- 703 71. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with imageJ. Biophotonics
704 Intern. 2004;11(7)36–42.
- 705

705 **Figure Captions**

706

707 **Fig 1. p62 interacts with Tax in peri-Golgi cytoplasmic structures.** (A) HeLa cells were
708 transfected with an empty vector or a Tax-His-encoding vector for 24 h, as indicated. Cells
709 were fixed, permeabilized and stained with His-specific (green) and p62-specific (red)
710 antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Representative images obtained by
711 confocal microscopy are shown. Both Tax and p62 signals were quantified along the segment
712 represented on the merge panel and plotted on the histogram. Arrowhead shows a Tax-
713 positive cell. Scale bar = 10 μ m. (B) Jurkat and HTLV-1 chronically infected C8166 cells
714 were fixed, permeabilized and stained with Tax-specific (green) and p62-specific (red)
715 antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Representative images obtained by
716 confocal microscopy are shown. Both Tax and p62 signals were quantified along the segment
717 represented on the merge panel and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μ m. (C) HeLa
718 cells were transfected with an empty vector or a Tax-His-encoding vector for 24 h, as
719 indicated. Cells were fixed, permeabilized and stained with His-specific (green), p62-specific
720 (red) and GM130-specific (blue) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (gray).
721 Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Tax, p62 and GM130
722 signals were quantified along the segment represented on the merge panel and plotted on the
723 histogram. Scale bar = 10 μ m. (D) Lysates from HeLa cells transiently expressing His-tagged
724 Tax were immunoprecipitated with a p62-specific antibody or control IgG and western blot
725 analysis was performed using His- and p62-specific antibodies. Ig HC, Ig heavy chains. (E)
726 Lysates from HeLa cells transiently expressing Tax-His (HeLa-Tax-His) and from HTLV-1
727 chronically infected C8166 cells were immunoprecipitated with a p62-specific antibody or
728 control IgG. Western blot analysis was performed using Tax- and p62-specific antibodies. Ig

729 HC, Ig heavy chains.

730

731 **Fig 2. Tax and p62 interact in a direct and ubiquitin-independent manner.** (A) HeLa

732 cells were transfected with constructs encoding either wild type Tax-His, ubiquitination-

733 defective Tax-K4-8R-His and Tax-K0-His or HBZ-His for 24 h, as indicated. Cell lysates

734 were immunoprecipitated with a p62-specific antibody or control IgG and western blot

735 analysis was performed using His- and p62-specific antibodies. Ig HC, Ig heavy chains. (B)

736 *p62* knockout (*p62*^{-/-}) MEF cells were transfected with constructs encoding Tax-His and

737 either Myc-tagged full-length p62 (p62^{FL}) or p62^{ΔUBA} for 24 h, as indicated. Cell lysates

738 were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody and western blot analysis was

739 performed using His- and Myc-specific antibodies. (C) GST and GST-tagged p62 were

740 expressed in bacteria, immobilized on glutathione-coupled Sepharose beads and used for GST

741 pulldown of *in vitro* translated ³⁵S-labeled Tax. Inputs as well as eluates were run on SDS-

742 PAGE gels and autoradiography was performed. CBB, Coomassie brilliant blue-stained SDS-

743 PAGE gel. (D) Cartoon of domain organization of p62 with deletion constructs used for GST-

744 and MBP- pulldown assays to map the binding site for Tax indicated below. The results of the

745 pulldown assays in E and F to map binding of Tax are indicated to the right of the deletion

746 constructs (plus and minus signs). PB1, Phox and Bem1 domain; ZZ, zinc finger domain;

747 MIR, multiple protein interaction region; LIR, LC3-interacting region; KIR, KEAP1

748 interacting region; UBA, ubiquitin-associated domain. (E) GST pulldown assays and (F)

749 MBP pulldown assays performed with deletion constructs of p62 to map the binding site of

750 Tax. The binding in percentage of input radioactively labeled-Tax was quantified from three

751 independent experiments and is shown as mean ± SEM above the autoradiographs of the

752 SDS-PAGE gels. CBB, Coomassie brilliant blue-stained SDS-PAGE gel.

753

754 **Fig 3. p62 potentiates Tax-dependent NF- κ B activation.** (A-C) Wild type (WT) and p62
755 knockout (p62^{-/-}) MEF cells were transfected with increasing doses of Tax-His as indicated,
756 together with (A) a NF- κ B-luc or (B) an HTLV-1-LTR-luc construct for 24 h. Luciferase
757 activity was measured and normalized, and is shown as fold induction over the corresponding
758 Tax-negative condition. Graphs show the means \pm SEM of at least 3 independent
759 experiments. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used to compare means
760 (**, p<0.01; ns, p>0.05). (C) Cell lysates were immunoblotted and analyzed using His- and
761 p62-specific antibodies. (D-F) HEK293T cells were transfected with control (siCTRL) or
762 p62-specific (sip62) siRNA for 24 h, followed by a second transfection for another 24 h with
763 the same siRNA and increasing doses of Tax-His, as indicated and (D) a NF- κ B-luc or (E) an
764 HTLV-1-LTR-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized, and is shown
765 as fold induction over the corresponding Tax-negative condition. Graphs show the means \pm
766 SEM of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test
767 was used to compare means (*, p<0.05; ns, p>0.05). (F) Cell lysates were immunoblotted and
768 analyzed using His- and p62-specific antibodies.

769

770 **Fig 4. p62 associates with the Tax/IKK γ signalosome.** (A) HeLa cells were transfected with
771 Tax-His for 48 h and then fixed, permeabilized and stained with His-specific (blue), p62-
772 specific (red) and IKK γ -specific (green) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI
773 (gray). A representative image obtained by confocal microscopy is shown. Arrowhead shows
774 a Tax-positive cell. A magnification is shown for both Tax-positive and Tax-negative cells.
775 Tax, p62 and IKK γ signals were quantified along the segments represented on the merge
776 panel and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μ m. (B) HeLa cells were transfected with

777 an empty vector or a Tax-His-encoding vector for 24 h, as indicated. Cell lysates were
778 immunoprecipitated with a p62-specific antibody or control IgG and western blot analysis
779 was performed using His-, p62- and IKK γ -specific antibodies. (C) HeLa cells were
780 transfected with Tax-His and/or IKK γ -FLAG vectors for 24 h, as indicated. Cell lysates were
781 submitted to a FLAG-immunoprecipitation followed by a His-specific Ni-NTA purification.
782 Western blot analysis was then performed using p62-, His- and FLAG-specific antibodies. (D)
783 Wild type (WT) and *p62* knockout (*p62*^{-/-}) MEF cells were transfected with Tax-His- and
784 FLAG-IKK γ -encoding vectors, as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with a
785 FLAG-specific antibody and western blot analysis was performed using His-, p62- and IKK γ -
786 specific antibodies.

787

788 **Fig 5. Tax/p62 and Tax/OPTN structures are associated with autophagic membranes.**

789 (A) HeLa cells stably expressing GFP-LC3 were transfected with Tax-His for 48 h. Cells
790 were fixed, permeabilized and stained with His-specific (blue) and p62-specific (red)
791 antibodies. A representative image obtained by confocal microscopy is shown. Tax, p62 and
792 GFP-LC3 signals were quantified along the segment represented on the merge panel and
793 plotted on the histogram. Arrowhead shows a Tax-positive cell. Scale bar = 10 μ m. (B) HeLa
794 cells were transfected with Tax-His for 48 h. Cells were fixed, permeabilized and stained with
795 His-specific (blue), p62-specific (red) and LAMP1-specific (green) antibodies. Nuclei were
796 counterstained with DAPI (gray). A representative image obtained by confocal microscopy is
797 shown. Arrowhead shows a Tax-positive cell. Scale bar = 10 μ m. (C) HeLa cells stably
798 expressing GFP-LC3 were transfected with Tax-His for 48 h. Cells were fixed, permeabilized
799 and stained with His-specific (blue) and OPTN-specific (red) antibodies. A representative
800 image obtained by confocal microscopy is shown. Tax, OPTN and GFP-LC3 signals were

801 quantified along the segment represented on the merge panel and plotted on the histogram.

802 Arrowheads show two Tax-positive cells. Scale bar = 10 μ m.

803

804 **Fig 6. Formation of autophagic membranes is required for efficient Tax-induced NF- κ B**

805 **signaling.** (A) HEK293T cells were transfected with control (siCTRL), *ATG7*-specific

806 (siATG7), *ATG5*-specific (siATG5) or *BECN1*-specific (siBECN1) siRNA for 24 h, followed

807 by a second transfection for another 24 h with the same siRNA, along with Tax-His and a NF-

808 κ B-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized, and is shown as fold

809 induction over the Tax-negative control, normalized to 1 for the control siRNA condition. The

810 graphs show the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. One-tailed paired

811 Student's t-test was used to compare means (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). Cell lysates were

812 immunoblotted and analyzed using ATG7-, ATG5-, Beclin1- and His-specific antibodies. (B)

813 HEK293T cells were transfected with control (siCTRL) or *ATG7*-specific (siATG7) siRNA

814 for 24 h, followed by a second transfection for another 24 h with the same siRNA, Tax-His

815 and Myc-p62, as indicated, together with a NF- κ B-luc construct. Luciferase activity was

816 measured and normalized, and is shown as fold induction compared to the corresponding

817 Myc-p62-negative condition. The graph shows the means \pm SEM of at least 3 independent

818 experiments. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used to compare means

819 (**, $p < 0.01$). Cell lysates were immunoblotted and analyzed using ATG7-, His- and p62-

820 specific antibodies. (C) HEK293T cells were transfected with control (siCTRL) or *ATG7*-

821 specific (siATG7) siRNA for 24 h, followed by a second transfection for another 24 h with

822 the same siRNA, Tax-His and VSV-OPTN, as indicated, together with a NF- κ B-luc construct.

823 Luciferase activity was measured and normalized, and is shown as fold induction compared to

824 the corresponding VSV-OPTN-negative condition. The graph shows the means \pm SEM of at

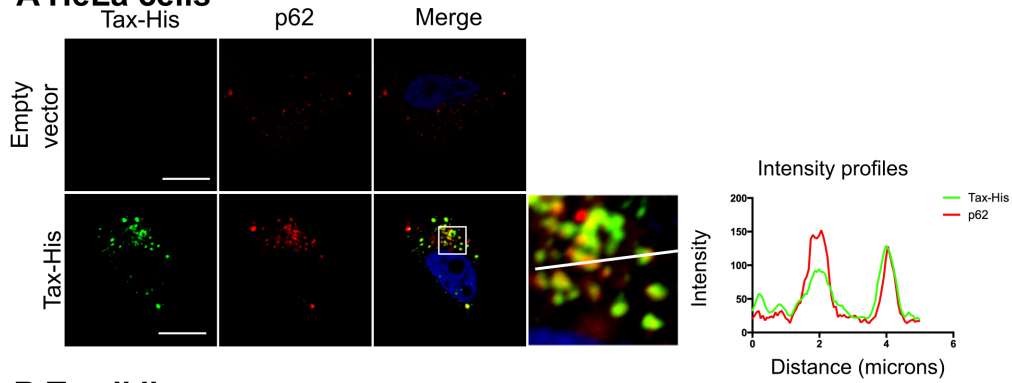
825 least 3 independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used
826 to compare means (*, $p < 0.05$). Cell lysates were immunoblotted and analyzed using ATG7-,
827 His- and VSV-specific antibodies.

828

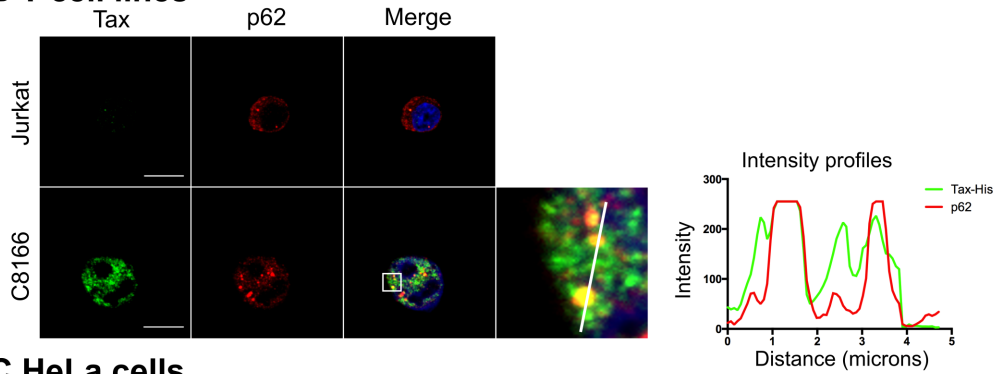
829 **Fig 7. Model of the involvement of selective autophagic receptors in Tax-induced NF- κ B**
830 **activation at autophagic membranes.** Tax-induced NF- κ B activation may occur in a two-
831 step process: (1) assembly of the Tax/IKK γ signalosome on Golgi membranes allowing initial
832 NF- κ B signaling, followed by (2) recruitment of the signalosome onto autophagic membranes
833 by SLRs (upon which p62 and OPTN), allowing an enhanced NF- κ B signaling. See text for
834 further discussion. T1BP1: TAX1BP1. Artwork was designed from Servier Medical Art used
835 under CC BY 3.0 FR.

Figure 1

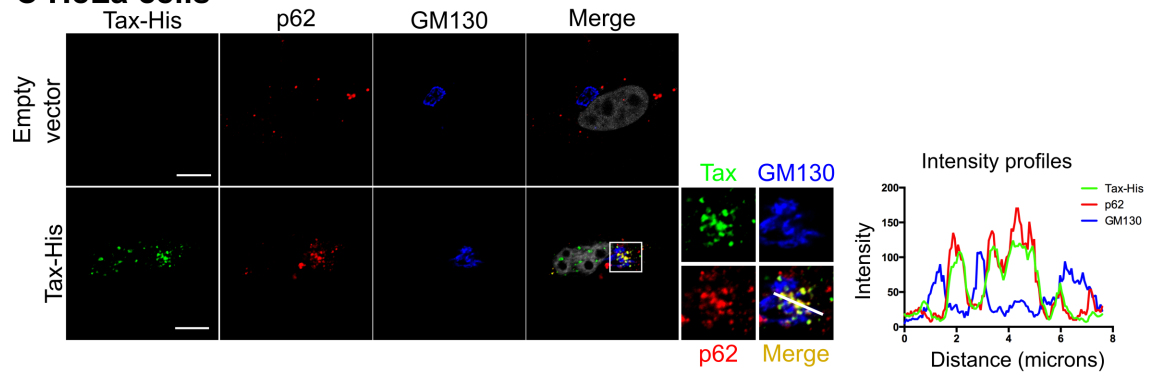
A HeLa cells



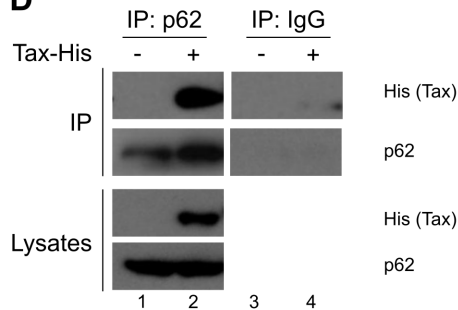
B T-cell lines



C HeLa cells



D



E

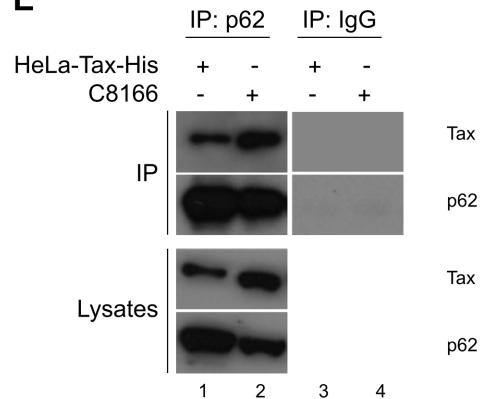


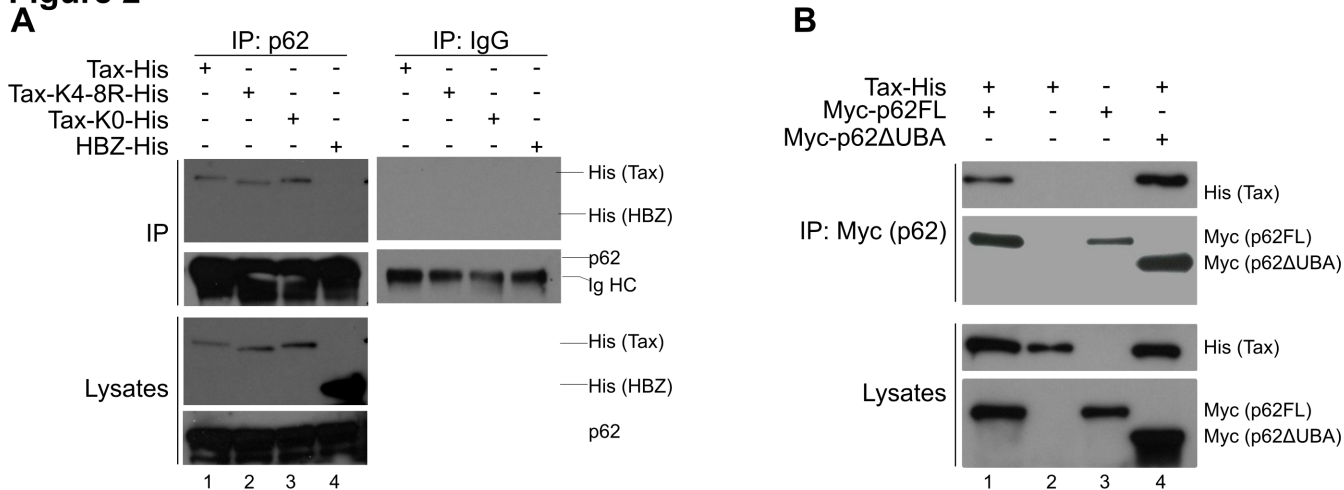
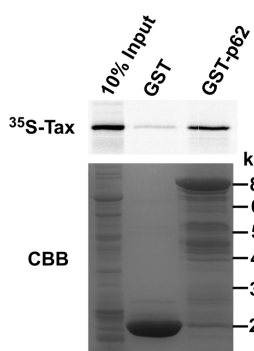
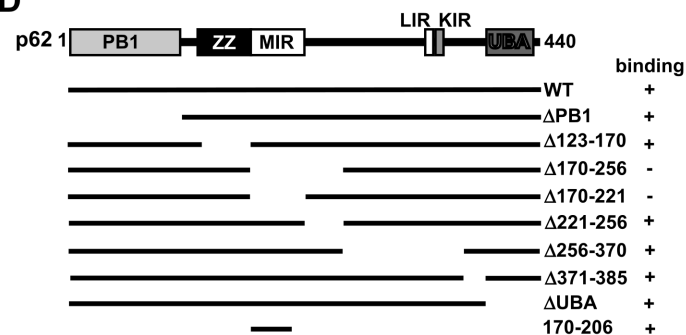
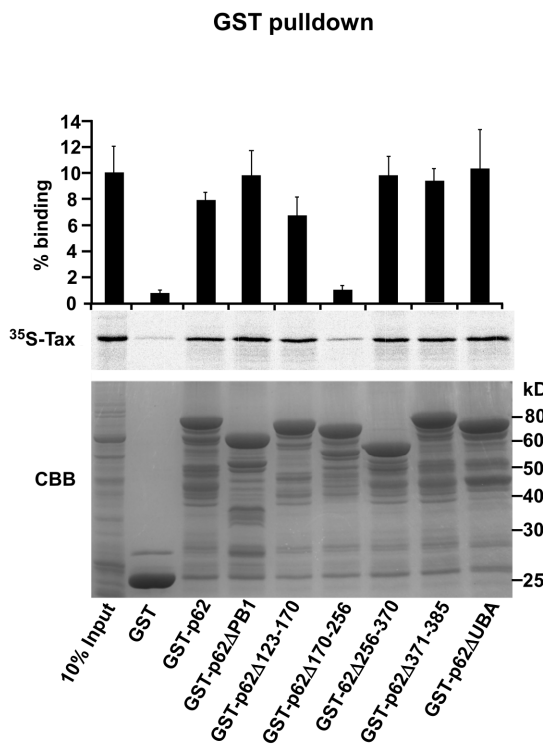
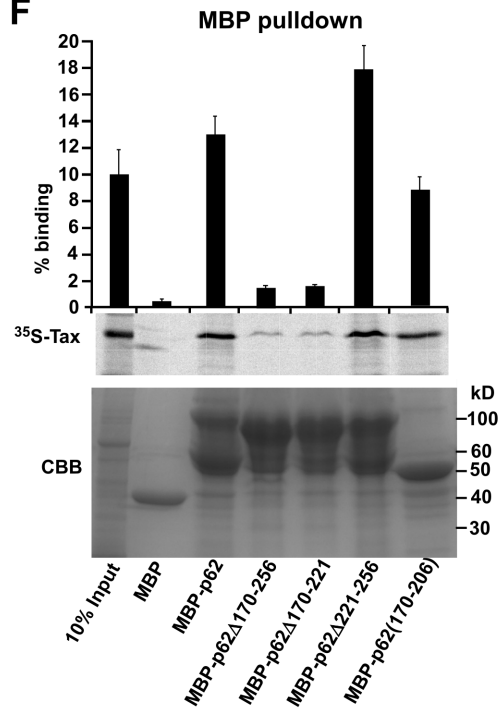
Figure 2**C****D****E****F**

Figure 3

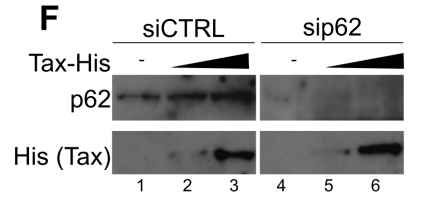
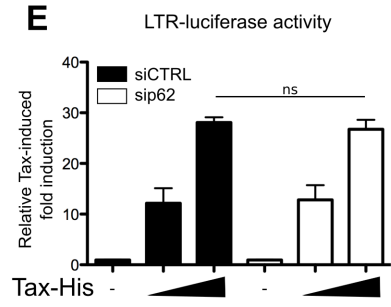
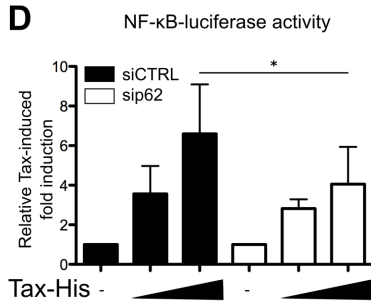
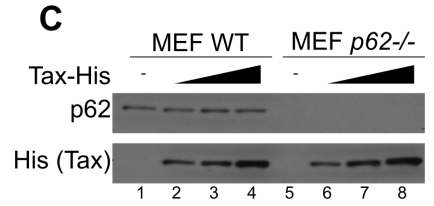
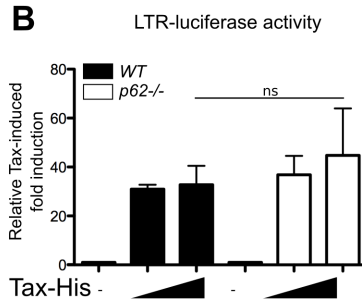
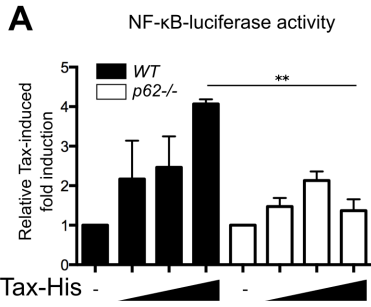


Figure 4

A HeLa cells

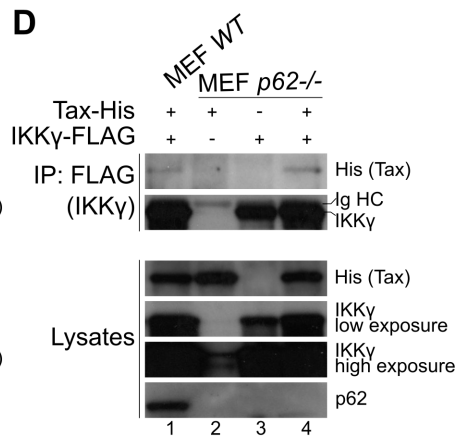
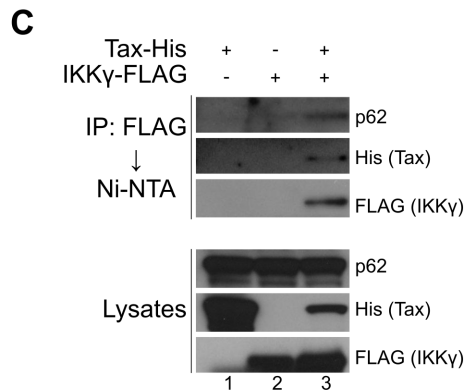
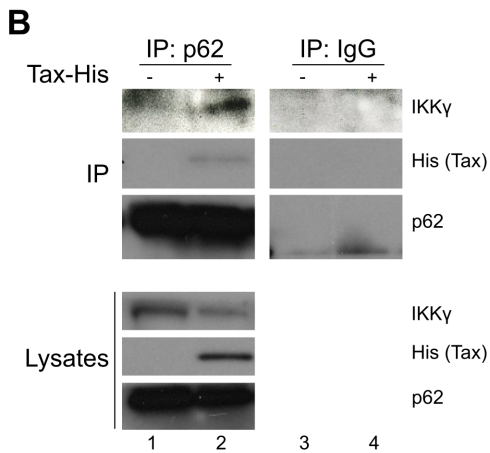
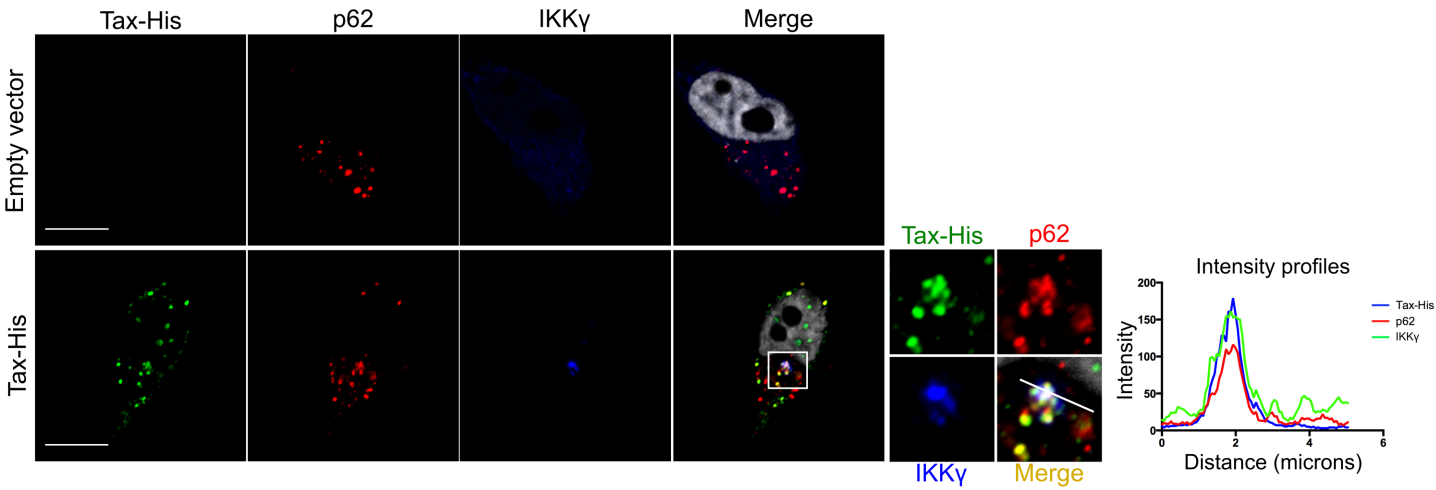
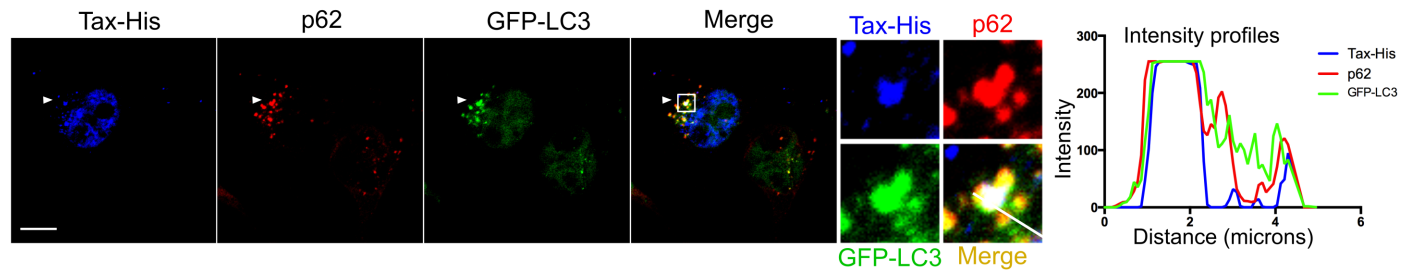
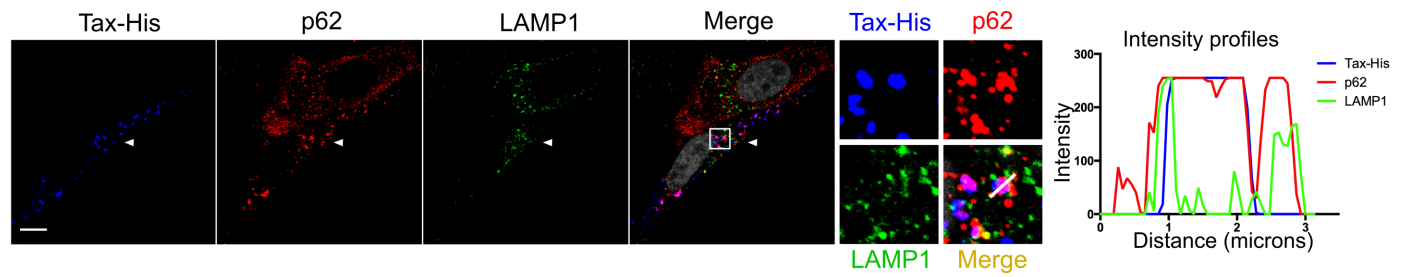


Figure 5

A GFP-LC3 HeLa cells



B HeLa cells



C GFP-LC3 HeLa cells

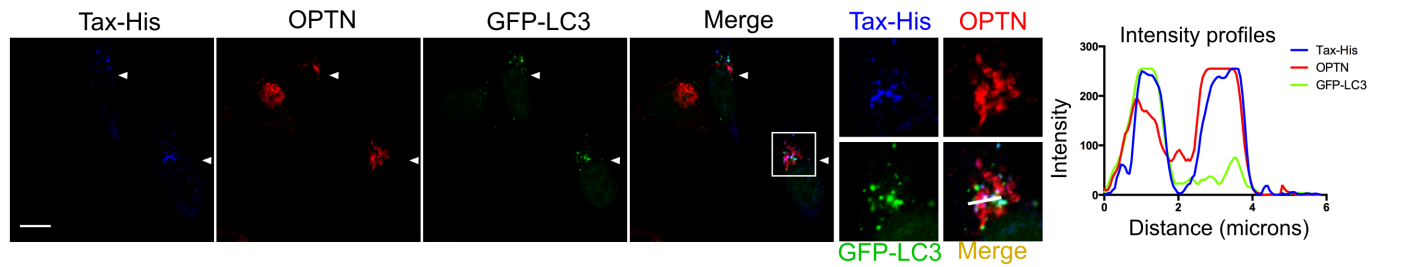
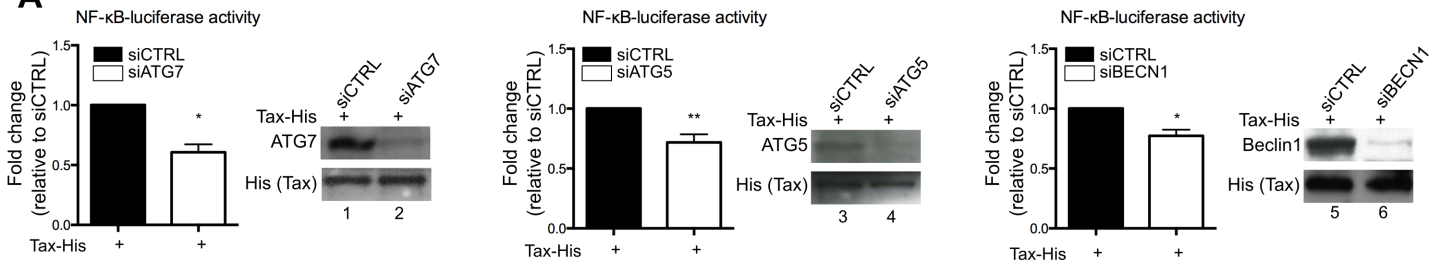
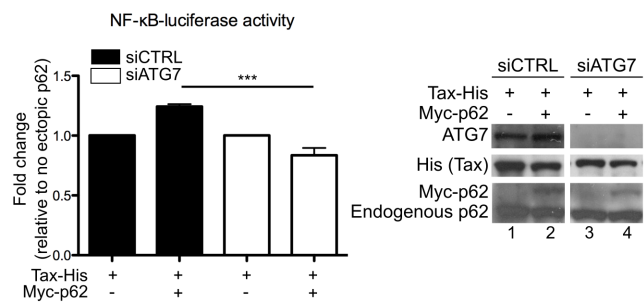


Figure 6

A



B



C

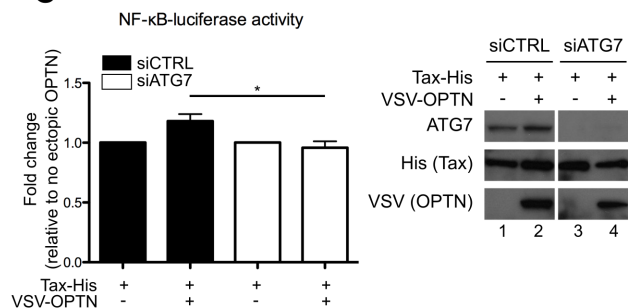
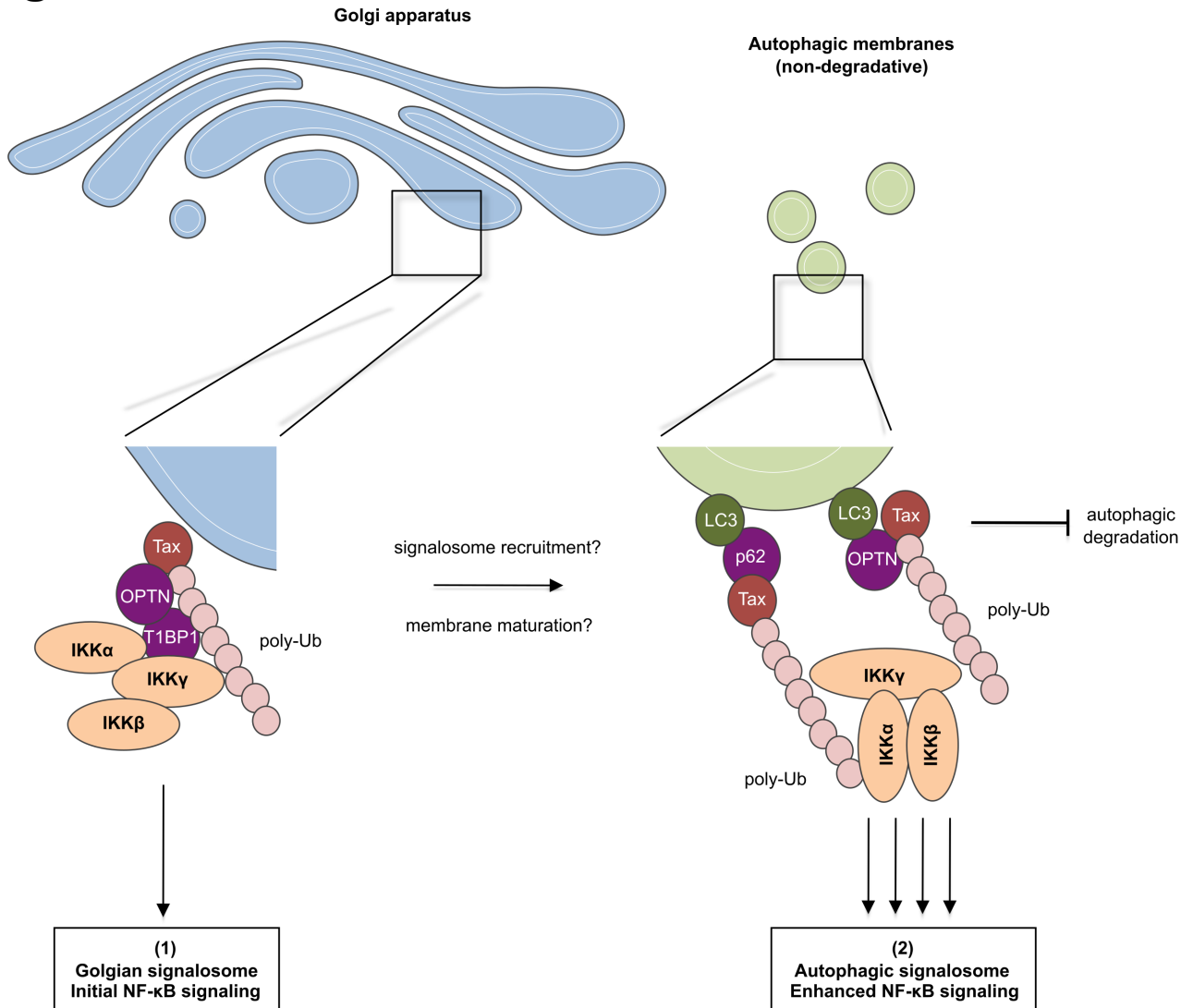


Figure 7



Liste des communications en congrès

2017

- 18^e Conférence internationale de rétrovirologie humaine – Présentation orale - *HTLV1 Tax-Induced NF- κ B Activation Is Potentiated by Selective Autophagy Receptors at Autophagic Membranes*, Tokyo, Japon.

2016

- 6^e Congrès du Club Francophone de l'Autophagie – Présentation orale - *HTLV Tax-induced NF- κ B activation is regulated by the receptor p62 at autophagic membranes*, Bordeaux, France.
- Congrès "HTLV European Research Network (HERN)" - Présentation orale - *The selective autophagy receptor SQSTM1/p62 regulates HTLV1 Tax-induced NF- κ B activation at autophagic membranes*, Bucarest, Roumanie.
- Journées Francophones de Virologie – Poster - *Régulation de la voie NF- κ B médiée par la protéine Tax de HTLV-1 par le récepteur de l'autophagie sélective p62*, Paris, France.
- Congrès "Viruses - At the Forefront of Virus-Host Interactions" – Poster - *p62 regulates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation*, Bâle, Suisse.

2015

- 17^e Conférence internationale de rétrovirologie humaine - Présentation orale - *p62 regulates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation* (présentation par le Dr. Chloé Journo), Les Trois-Îlets, Martinique.

2014

- Congrès "HTLV European Research Network (HERN)" – Présentation orale - *HTLV-1 Tax is a target of selective autophagy receptors, resulting in NF- κ B and viral replication regulation*, Rome, Italie.

Rôle des récepteurs de l'autophagie sélective dans la modulation de la signalisation NF- κ B par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1

L'activation constitutive de la voie NF- κ B est une étape cruciale dans le processus de transformation des lymphocytes T par le virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1). La protéine virale Tax y joue un rôle majeur en recrutant la protéine régulatrice IKK γ . De précédents travaux effectués par notre équipe ont montré que l'activation de la voie NF- κ B par Tax est promue par le recrutement des facteurs cellulaires Optineurine (OPTN) et Tax1-binding protein 1 (TAX1BP1), deux protéines récemment décrites comme des membres de la famille de récepteurs autophagiques Sequestosome-Like Receptors (SLR), posant la question des liens fonctionnels entre la signalisation NF- κ B et la machinerie autophagique.

Notre étude décrit l'interaction de Tax avec le récepteur p62, autre membre de la famille des SLR. L'interaction est directe et indépendante de l'ubiquitination de Tax. Les facteurs Tax, p62 et IKK γ forment des complexes localisés au niveau de membranes autophagiques. Le facteur p62 promeut spécifiquement l'activation de la voie NF- κ B médiée par Tax. Étonnamment, la sur-expression de p62 limite la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B, en induisant la déplétion cytosolique de Tax. Ces résultats indiquent que p62 peut exercer des effets antagonistes sur Tax selon son taux d'expression. Des données préliminaires suggèrent que Tax lie également d'autres membres de la famille des SLR, avec des conséquences variables sur l'activation de la voie NF- κ B.

Ce travail apporte des connaissances nouvelles concernant les relations entre Tax, la signalisation NF- κ B et la machinerie autophagique, suggérant l'utilisation des membranes autophagiques comme plateformes de signalisation virale.

Mots clés : HTLV-1, Tax, Oncogenèse virale, Autophagie, p62, Signalisation, NF- κ B, Plateformes de signalisation.