



**HAL**  
open science

# Rôle de l'activation chronique de la voie NF-kB induite par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 dans la régulation de l'épissage alternatif

Lamya Ben Ameer

► **To cite this version:**

Lamya Ben Ameer. Rôle de l'activation chronique de la voie NF-kB induite par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 dans la régulation de l'épissage alternatif. Génétique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1136 . tel-02528822

**HAL Id: tel-02528822**

**<https://theses.hal.science/tel-02528822>**

Submitted on 2 Apr 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1136

## **THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° 340**  
**BIOLOGIE MOLÉCULAIRE INTÉGRATIVE ET CELLULAIRE**

**Spécialité de doctorat** : Biologie moléculaire, Génétique  
**Discipline** : Science de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 13/09/2019, par :  
**Lamya Ben Ameer**

---

# **Rôle de l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B induite par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 dans la régulation de l'épissage alternatif**

---

Devant le jury composé de :

Faure Mathias

Professeur des universités

Président

Fernandez de Luco Reini  
Pique Claudine

Chargé de recherche  
Directrice de recherche

Rapporteur.e  
Rapporteur.e

Mortreux Franck

Chargé de recherche

Directeur de thèse

# Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : le Pr. Mathias Faure, le Dr. Reini Luco et le Dr. Claudine Pique de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et pour la teneur de la discussion scientifique au cours de la soutenance.

Je remercie le Dr. Pierre Jalinot de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et au sein de son équipe pendant mon stage de M2.

Je remercie le Dr. Didier Auboeuf pour m'avoir ouvert les portes de son équipe et pour tous nos échanges scientifiques et son expertise précieuse.

Je remercie mon directeur de thèse le Dr. Franck Mortreux de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse et de m'avoir accompagnée tout au long de ces quatre années et demi.

Cette aventure a commencé en M2R où j'ai effectué mes premiers pas au sein d'un laboratoire de recherche pour prendre la suite du projet initié par Morgan Thénoz. Aujourd'hui nous proposons un nouveau mécanisme de régulation de l'épissage alternatif par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B/RelA et l'hélicases à ARN DDX17. Nous avons parcouru un long chemin ensemble qui m'a permis d'énormément progresser et d'évoluer. Je souhaite par ces quelques mots vous montrer ma gratitude et vous remercier pour vos nombreux conseils et toutes nos discussions scientifiques.

Je remercie la Ligue National contre le Cancer de m'avoir financée durant ces trois années et demie et de m'avoir offert l'opportunité de poursuivre cette thèse.

Je remercie le Dr. Cyril Bourgeois pour son implication et ses précieux conseils prodigués tout au long de ma thèse.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse : les Docteurs Hélène Dutartre, Martin Dutertre et Vincent Mocquet d'avoir accepté de participer à ma formation et de m'avoir accompagnée et guidée dans mon travail.

Je tiens également à remercier notre collaborateur Thomas Sexton et son équipe de m'avoir accueillie. Je remercie plus particulièrement Sanjay Chahar de m'avoir formée aux techniques de Chromosome Conformation Capture technique (Hi-C).

De très nombreuses personnes et collaborateurs sont à remercier pour leurs contributions scientifiques et humaines dans la réalisation et l'aboutissement de ce travail de thèse ces remerciements ne sauraient être exhaustifs.

En effet, je tiens à remercier tous les bio-informaticiens de notre équipe, Jean Baptiste Claude, Sébastien Lemaire, Hélène Polvèche et Nicolas Fontrodona qui ont répondu avec calme et patience au feu nourri de mes questions quotidiennes.

Je remercie Fabien Aubé pour son aide dans la mise en place de technologie CRISPR-VPR dans le cadre du projet lncRNA.

Je tiens à remercier le docteur Guillaume Giraud pour son implication dans mon projet de thèse, notamment dans la mise en place dans l'équipe de la technologie de TALEs. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, ce fut une chance pour moi d'avoir bénéficié de tes nombreux conseils et de ta grande sagesse.

Je remercie également Emmanuel Combe pour sa contribution dans ce travail. Travailler avec toi a été un plaisir, je te remercie pour ton implication inconditionnelle, ton sens du détail, mais surtout, je te remercie pour toutes ces heures que tu as passées à mes côtés pour m'aider.

Il m'est impossible d'oublier Sophie Terrone pour notre belle collaboration qui a permis la mise en place des techniques de Chromosome Conformation Capture au sein de l'équipe.

Enfin, je remercie mes amis, ma famille et plus particulièrement mes parents pour m'avoir encouragée et accompagnée tout au long de mon cursus.

# Résumé

## Rôle de l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B induite par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 dans la régulation de l'épissage alternatif

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) régule la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation. L'activation chronique de cette voie est fréquemment retrouvée associée à des désordres inflammatoires et des cancers. Les impacts fonctionnels de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ont été jusqu'à présent étudiés à l'échelle des promoteurs. Néanmoins, les études récentes de la distribution chromatinienne de NF- $\kappa$ B indiquent que la sous-unité NF- $\kappa$ B RelA se localise majoritairement dans les régions intragéniques, incluant des exons et des introns, où ses fonctions restent inconnues. Mes travaux ont consisté à adresser cette question dans le contexte de l'infection par le virus HTLV-1, un activateur chronique de la voie NF- $\kappa$ B, responsable de la leucémie T de l'adulte. Mes données montrent que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'oncogène viral Tax de HTLV-1 s'accompagne de modifications de l'épissage alternatif d'exons riches en GC qui coïncident avec le recrutement chromatinien de RelA à proximité de ces exons régulés. Les analyses intégratives des profils d'épissage et du remodelage de la chromatine, combinées à des essais de ciblage expérimental de la chromatine (TALE), démontrent que la fixation intragénique de RelA permet de recruter le régulateur d'épissage DDX17 pour moduler l'épissage alternatif de l'exon via son activité hélicase. Ces données révèlent que, outre ses fonctions transcriptionnelles, le facteur NF- $\kappa$ B RelA agit comme une ancre chromatinienne pour le facteur d'épissage DDX17 et fournit une spécificité de régulation d'épissage alternatif. Ces données revisitent nos connaissances des mécanismes physiopathologiques des maladies associées à HTLV-1 ainsi que d'autres désordres liés à l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B.

Mots clés : Épissage alternatif, NF- $\kappa$ B, Chromatine, Facteur de transcription, Tax, HTLV-1, DDX5, DDX17

# Abstract

## The Impact of the NF- $\kappa$ B chronic activation mediated by the HTLV-1 Tax oncoprotein on alternative splicing regulation

The NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) signaling pathway regulates gene transcription of genes involved in immune response and inflammation. Chronic activation of NF- $\kappa$ B frequently associated with inflammatory disorders and cancer. The functional impacts of NF- $\kappa$ B have long been studied at the promoter level. Nevertheless, recent studies of the chromatin distribution of RelA indicate that this NF- $\kappa$ B subunit is predominantly localized in intragenic regions, including exons and introns, where its functions remain unknown. My work has addressed this question in the context of HTLV-1 infection, which is a constitutive activator of NF- $\kappa$ B, and the causative agent of the Adult T-cell Leukemia. The results show that the activation of NF- $\kappa$ B by the viral oncoprotein Tax results in changes in alternative splicing regulations of GC-rich exons that coincide with the chromatin recruitment of RelA in the vicinity of these exons. Integrative analysis of RNA splicing and chromatin occupancy, combined with experimental chromatin tethering assays (TALE) demonstrate that the intragenic binding of RelA leads to the recruitment of the splicing regulator DDX17, which modulates the inclusion rate of exon thanks to its helicase activity. Altogether, these data reveal that, besides its transcriptional role, NF- $\kappa$ B RelA acts as a chromatin anchor for the splicing factor DDX17 and provides alternative splicing specificity. These data revisit our knowledge of the physiopathologic mechanisms of HTLV-1 associated diseases, as well as other disorders related to the chronic activation of the NF- $\kappa$ B pathway.

Key words: Alternative splicing, NF- $\kappa$ B, Chromatin, Transcription factor, Tax, HTLV-1, DDX5, DDX17

# Sommaire

<i>Préambule</i> .....	15
<i>Introduction</i> .....	16
<b>I. Le rétrovirus HTLV-1</b> .....	17
<b>A. Épidémiologie</b> .....	17
<b>B. Les pathologies associées à HTLV-1 et les traitements</b> .....	19
1. La leucémie T de l'adulte (ATL) .....	19
2. La paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP) et les autres maladies inflammatoires associées à l'infection .....	21
<b>C. Les modes de transmission du virus</b> .....	22
<b>II. Stratégie infectieuse du virus HTLV-1</b> .....	24
<b>A. Structure du virus HTLV-1</b> .....	24
1. La particule virale .....	24
2. Le génome viral et le cycle réplicatif par reverse-transcription.....	25
3. Les protéines virales.....	27
<b>B. Les étapes majeures de l'infection</b> .....	29
1. Les cellules cibles .....	29
2. Les récepteurs viraux .....	30
3. Transmission cellule-cellule .....	30
<b>C. Réplication par expansion clonale</b> .....	33
<b>D. Régulation de l'expression des gènes viraux</b> .....	36
1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de Tax .....	36
2. Tax active l'expression virale .....	37
3. Rex, p13 <sup>h</sup> , p30 <sup>h</sup> , et HBZ, des trans-inhibiteurs de l'expression des gènes viraux.....	38
<b>E. L'infection par HTLV-1 dérégule l'expression des gènes cellulaires</b> .....	41
1. Impact quantitatif sur le transcriptome cellulaire .....	41
2. Modifications qualitatives du transcriptome cellulaire .....	44
<b>F. L'oncoprotéine Tax</b> .....	45
1. Effets pléiotropes de Tax sur les systèmes cellulaires .....	46
2. Tax : un transactivateur transcriptionnel des gènes cellulaires .....	49
<b>III. La voie de signalisation NF-<math>\kappa</math>B : un acteur majeur de la physiopathogénie de l'infection</b> .....	52
<b>A. Activation physiologique de la voie NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	52
1. Généralités .....	52
2. Au niveau cytoplasmique .....	54
3. Au niveau nucléaire.....	57
.....	64
<b>B. Activation chronique de la voie NF-<math>\kappa</math>B dans les cellules infectées par le virus HTLV-1</b> .....	71
1. Au niveau cytoplasmique .....	71
2. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax induit la sénescence cellulaire .....	77

<b>C.</b>	<b>Rôle de l'activation constitutive de la voie NF-<math>\kappa</math>B induite par Tax dans l'expression génique</b>	<b>79</b>
1.	Au niveau quantitatif .....	79
2.	Au niveau qualitatif .....	80
<b>IV.</b>	<b><i>L'épissage alternatif : un mécanisme de régulation de la diversité structurale des transcrits cellulaires couplés à la transcription</i></b>	<b>81</b>
<b>A.</b>	<b>Qu'est-ce que l'épissage ?</b>	<b>81</b>
1.	Les sites d'épissages .....	81
2.	Assemblage du splicéosome et réaction d'épissage .....	82
<b>B.</b>	<b>L'épissage Alternatif</b>	<b>84</b>
1.	Les facteurs d'épissage et leurs séquences de régulation .....	86
2.	Les structures secondaires des transcrits .....	89
3.	Les hélicases à ARN DDX5 et DDX17 .....	89
<b>C.</b>	<b>Les mécanismes de couplage transcription et épissage alternatif</b>	<b>95</b>
1.	Le modèle de recrutement .....	95
2.	Le modèle de cinétique .....	98
3.	Un rôle des facteurs de transcription dans la régulation de l'épissage alternatif .....	100
<b>D.</b>	<b>Contrôle de l'épissage par la régulation de la chromatine</b>	<b>103</b>
1.	Le nucléosome : une barrière à l'élongation transcriptionnelle .....	103
2.	Les modifications d'histones impactent la régulation de l'épissage .....	104
3.	L'état chromatinien et les ARNs non codants .....	106
4.	La méthylation de l'ADN module l'épissage alternatif .....	106
5.	Organisation tridimensionnelle de la chromatine et régulation de l'épissage alternatif .....	108
	<b>Résultats</b> .....	<b>110</b>
	<b>Discussion et Perspectives</b> .....	<b>145</b>
	<b>Conclusion générale</b> .....	<b>157</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>159</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>164</b>

# Liste des abréviations

**3C** : Chromosome Conformation Capture

**4C** : Circular Chromosome Conformation Capture

**5mC** : 5-méthylcytosine

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AGO** : ArGOnaute

**AP-1**: Activator Protein 1

**ARN**: Acide ribonucléique

**ARNm**: Acide ribonucléique messenger

**ARNnh**: ARN nucléaire hétérogène

**ARNpré-m**: ARN pré-messenger

**ARNr**: ARN ribosomaux

**ARNt** : ARN de transfert

**ATAC-seq** : Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing

**ATF** : Activating Transcription Factor

**ATL** : Adult T-cell Leukaemia

**AZT** : azidothymidine

**BER** : Base Excision Repair

**CADM1** : Cell adhesion molecule 1

**CBC** : Cap Binding Complex

**CBP** : CREB binding protein

**CCR4** : C-C Chemokine Type 4

**CDK** : Cyclin Dependant Kinase

**ChIP** : Immunoprécipitation de chromatine

**CLIP-seq** : Crosslinking and immunoprecipitation

**CMH-1** : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1

**CPSF** : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor

**CRE** : cyclic AMP response element

**CREB** : cyclic AMP response element binding protein

**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**CTCF** : CCCTC- binding Factor

**CTD** : Carboxy Terminal Domain

**C-ter** : Carboxy-terminal

**CTL** : Cytotoxic T lymphocytes, lymphocytes T cytotoxiques

**DC** : Cellules dendritiques

**DNMT** : DNA MethylTransferase

**EHMT2** : Euchromatic Histone-lysine N-MethylTransferase 2

**EJC** : Exon Junction Complex

**Env** : Enveloppe

**ESE** : Exonic Splicing Enhancer

**ESS** : Exonic Splicing Silencer

**EZH2** : Enhancer of Zest Homolog 2

**FoxP3** : Foxkhead box P3

**Gag** : Group specific antigen

**GLUT-1** : Glucose Transporter 1

**H3K9me** : méthylation de la lysine 9 de l'histone H3

**HBZ** : HTLV-1 Associated Myelopathy

**HDAC** : Histone Deacétylase

**HEK293T** : Cellules embryonnaires de rein humain 293 contenant l'antigène T du SV40

**Hi-C** : High-throughput Chromosome Conformation Capture

**HLA** : Human leukocyte antigen

**HMTase** : Histone Methyltransferase

**hnRNP** : heterogenous nuclear RiboNucleoProtein

**HSC** : cellules souches hématopoïétique

**HSPG** : Heparan Sulfate Proteoglycans

**HTLV-1** : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 1

**HTLV-2** : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 2

**ICAM-1** : Intercellular adhesion molecule 1

**IgG** : Immunoglobuline G

**IκB** : Inhibitors of κB

**IKK** : IκB Kinase

**IL-2** : interleukine 2

**INF-α** : Interferon α

**ISE**: Intronic Splicing Enhancer

**ISS**: Intronic Splicing Silencer

**kb** : kilobase

**kDa** : Kilo Dalton

**LFA-1** : Lymphocyte Function-associated Antigen

**LncRNA**: long non coding RNA

**LT**: Lymphocytes T

**LTR**: Long Terminal Repeat

**MAPK**: Mitogen-activated Protein Kinases

**MBD**: methyl-CpG-binding domain

**MeDIP**: Immunoprécipitation de l'ADN Méthylé

**miRNA**: micro ARN

**NER**: Nucleotide Excision Repair

**NES** : Nuclear Export Signal

**NF-κB**: Nuclear Factor Kappa B

**NHEJ**: Non-Homologous End Joining

**NIK**: Nuclear Factor κB-inducing Kinase

**NLS**: Nuclear Localisation Signal

**NMD**: Nonsense-Mediated mRNA Decay

**NRP-1**: Neuropiline 1

**N-ter**: amino-terminal

**ORF**: Open Reading Frame

**Pb**: paire(s) de bases

**PBMC** : Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononuclées du sang périphérique)

**PCAF**: p300/CBP Associated Factor

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PDZ**: PSD-95/Discs large/ZO-1 homologous

**PI3K**: Phosphatidyl-inositol-3-Kinase

**PKA:** Protein Kinase A

**PMA:** Phorbol-12-Myristate-13-acetate

**PTB:** Polypyrimidine Tract Binding protein

**P-TEFb:** Positive Transcription Elongation Factor b

**PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog

**Rex:** Regulator of virion gene expression

**RNA-seq:** RNA sequencing

**RT:** Reverse Transcription

**sHBZ :** Spliced HTLV-1 b-Zip Factor

**siRNA:** petit ARN interférent

**snRNA:** small nuclear RNA

**snRNP:** small nuclear RiboNucleoProtein

**SPAR-seq :** Systematic Parallel Analysis of Endogenous RNA Regulation Coupled to Barcode Sequencing

**SRE :** Serum Response Element

**SRF :** Serum Response Factor

**STLV-1 à 4 :** Virus simien T-lymphotrope de type 1

**SUV39H2 :** Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 2

**SWI/SNF :** Switch/Sucrose Non Fermentable

**TAD :** Transactivation Domain

**TALE :** Transcription Activator-Like Effector

**Tax :** Transactivator of pX region

**TBP :** TATA box Binding Protein

**TCR :** T-cell Receptor

**TFIID :** Transcription Factor II D

**TFIIH :** Transcription Factor II H

**TGF- $\beta$  :** Transforming Growth factor  $\beta$

**TKO :** Triple Knock-Out

**TNF- $\alpha$  :** Tumor Necrosis Factor alpha

**TRE :** Tax Responsive Element

**TSP/HAM :** Paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1

**usHBZ** : Unspliced HTLV-1 b-Zip Factor

**VCAM** : Vascular Cell adhesion molecule

# Table des illustrations

## Figures de la partie Introduction :

Figure 1 : Répartition géographique des principaux foyers d'infection du virus HTLV-1	18
Figure 2 : Développement de l'ATL	19
Figure 3 : Cellules en fleur (Flower cells)	21
Figure 4 : Représentation schématique du virion d'HTLV-1 et de ses protéines virales	25
Figure 5 : Cycle réplcatif du virus HTLV-1	26
Figure 6 : Structure du génome du virus HTLV-1	27
Figure 7 : Schéma des trois modes de transmission du virus HTLV-1	32
Figure 8 : Modèle des étapes de l'infection induite par HTLV-1 conduisant au développement de l'ATL	35
Figure 9 : Schéma de la structure et des domaines fonctionnels de Tax	36
Figure 10 : Modèle de transactivation du LTR 5' par Tax	38
Figure 11 : Modèle d'inhibition de l'expression du génome viral	39
Figure 12 : Schéma récapitulatif des dérégulations de l'expression des gènes cellulaire associées à l'infection par le virus HTLV-1	45
Figure 13 : L'oncoprotéine Tax dérégule des acteurs majeurs du cycle cellulaire	47
Figure 14 : Schéma simplifié des effets pléiotropiques de Tax	51
Figure 15 : Structure schématique des sous-unités NF- $\kappa$ B	53
Figure 16 : Schéma d'activation de la voie canonique	55
Figure 17 : Schéma d'activation de la voie non canonique	56
Figure 18 : Différentes combinaisons possibles formant le complexe NF $\kappa$ B et impact sur la transcription des gènes cibles	58
Figure 19 : Distribution chromatiniennne de RelA/p65	60
Figure 20 : Remodelage de la chromatine en réponse à l'activation de la voie NF $\kappa$ B	64
Figure 21 : Co-régulation hiérarchique de gènes répondant au TNF $\alpha$	67
Figure 22 : Mécanisme régulant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B	69
Figure 23 : Schéma d'activation de la voie canonique par Tax	73
Figure 24 : Schéma d'activation de la voie non canonique par Tax	74
Figure 25 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de Tax impliquées dans l'activation transcriptionnelle des gènes dépendant de la voie NF- $\kappa$ B	76
Figure 26 : Les sites de reconnaissance nécessaires à la détection de l'intron/exon par le splicéosome Séquences consensus d'épissage (ADN) : 5'SS (site donneur d'épissage), BP (point de branchement), PPT (polypyrimidine tract ou séquence riche en pyrimidine) et 3'SS (site accepteur d'épissage).	81
Figure 27 : Schéma des deux réactions de transestérification	82
Figure 28 : Les étapes d'assemblage du splicéosome	83
Figure 29 : Exemple d'épissage alternatif	84
Schéma explicatif simplifié de l'épissage alternatif. L'épissage alternatif est le processus par lequel un même transcrit primaire peut former au moins deux molécules d'ARN différentes. Un exon est dit alternatif s'il est retrouvé inclus ou exclu au sein de l'ARNm mature. Un gène peut ainsi produire plusieurs ARNm et par conséquent différentes isoformes protéiques dont leurs fonctions peuvent diverger.	84
Figure 30 : Schéma des différents types d'épissage alternatif En rouge et orange : exon (ou portion d'exon) alternativement inclus(e) ou exclu (e) dans l'ARN messenger mature.	85
Figure 31 : Régulation de l'épissage alternatif	87
Figure 32 : Schéma de régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR	88
Figure 33 : Schéma de régulation de l'épissage alternatif par les protéines hnRNPs (PTB) Lorsque le facteurs PTB se fixe au niveau de ESE, il empêche la reconnaissance du site d'épissage et le recrutement de U2 et U2AF induisant ainsi l'exclusion de l'exon cible.	88
Figure 34 : Les hélicases à ARN DDX5/17 sont des facteurs qui régulent le couplage transcription-épissage	90

Figure 35 : Exemple de régulation de l'inclusion de l'exon CD44v4	94
	97
Figure 36 : Inhibition de l'inclusion de l'exon EDI par le recrutement de SRSF3 au niveau du domaine CTD de ARN polymérase II	97
Figure 37 : Schéma du modèle cinétique	99

### **Figures de la partie Résultats :**

Figure 38 : Rôle de CTCF et la méthylation sur la régulation de l'épissage alternatif	107
Figure 1: TAX induces alternative splicing modifications independently of its transcriptional effects.	118
Figure S1: TAX-induced alternative splicing of CD44 in vivo and in vitro.	119
Figure 2: Physical interactions between TAX, RelA and DDX17 in an NF- $\kappa$ B dependent manner.	121
Figure 3: DDX5/17 regulates TAX splicing targets in an NF- $\kappa$ B-dependent manner.	123
Figure S2: DDX5/17 expression regulate TAX splicing targets.	124
Figure S3: Chromatin tethering of RelA and DDX17 regulates alternative splicing.	126
Figure 4: RelA locally recruits DDX17 at the genomic target exons for regulating splicing.	127
Figure 5: Chromatin and splicing regulation upon TALE-mediated tethering of RelA and DDX17.	129
Figure S4: Nested RT-PCR analysis of CD44 transcripts expressed in TALE assays and in cells expressing or not TAX.	130

### **Figures de la partie Discussion et Perspectives :**

Figure 39 : L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax permet de former des NF- $\kappa$ B factories	152
Figure 40 : L'expression de l'oncoprotéine Tax module l'organisation tridimensionnelle de chromatine.	153
Figure 41 : L'activation de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax empêche la rencontre entre l'exon CD44v10 et son promoteur	155
Figure 42 : Tax induit la formation du complexe NFKBIA et RELA qui permet leur co-régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	156

### **Figures de la partie Annexe :**

Figure Annexe 1 : Schéma de la technologie de Chromosome conformation capture 3C	161
Figure Annexe 2 : Contrôles de 3C utilisés (Figure 1 partie Discussion et Perspectives)	162
Figure Annexe 3 : Liste des techniques d'étude de la chromatine citées dans le manuscrit	163

### **Liste des Tables :**

Table 1 : Modifications post-traductionnelles de RelA et leurs impacts sur la transcription	62
Table 1 bis : Modifications post-traductionnelles de RelA et leurs impacts sur la transcription	70
Table 2 : Les partenaires des hélicases à ARN DDX5/DDX17	92
Table 3 : Rôle des histones et des modifications post-traductionnelles des histones dans la régulation de l'épissage	105

# Préambule

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B coordonne l'activité de facteurs de transcription essentiels à la régulation de l'expression des gènes contrôlant l'immunité, l'inflammation, et la survie cellulaire. Elle engage une coordination stricte de l'expression des gènes cibles de telle sorte que sa dérégulation, en particulier son activation chronique, s'accompagne régulièrement de perturbations transcriptionnelles et de désordres cellulaires graves pouvant aboutir à des inflammations chroniques et/ou des cancers. Les données récentes dans ce domaine indiquent que les corps des gènes (introns et exons) sont également des cibles privilégiées des facteurs NF- $\kappa$ B, suggérant que ces protéines pourraient porter d'autres fonctions dans la régulation de l'expression des gènes que celles initialement décrites au niveau des promoteurs. Mon travail de thèse a eu pour objectif de comprendre les mécanismes qui relient l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1 et les modifications de l'épissage alternatifs observées au cours de l'infection. Mes résultats mettent en évidence que la sous-unité NF- $\kappa$ B RelA confère des spécificités de cible d'épissage alternatif en recrutant à la chromatine, à proximité d'exons, le facteur d'épissage DDX17. Le présent manuscrit aborde en conséquence 3 vastes domaines incluant la physiopathologie de l'infection par HTLV-1, l'impact fonctionnel de la voie NF- $\kappa$ B, et les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif.

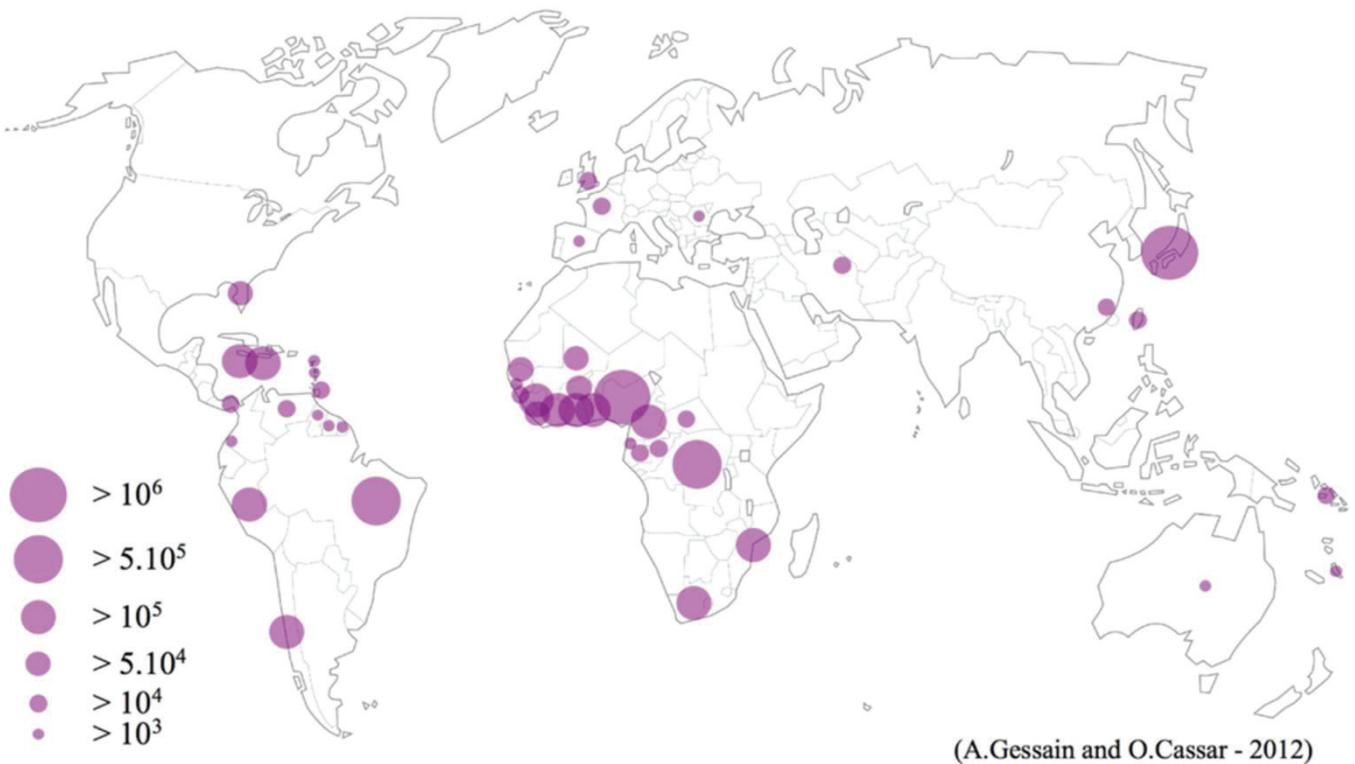
# Introduction

# I. Le rétrovirus HTLV-1

Le virus HTLV-1 (Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1) fait partie de la famille *Orthoretrovirinae* du genre *Deltaretrovirus*. Cette famille se compose des virus HTLV-1 à 4, des virus simiens STLV-1 à 4 et du virus de la leucémie bovine BLV. HTLV-1 est le premier rétrovirus oncogène humain isolé par l'équipe de R. Gallo en 1980 aux États-Unis à partir d'une culture de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Poiesz et al., 1980; Yoshida et al., 1982). Il est l'agent étiologique de la leucémie T de l'adulte ou ATL (Adult T cell leukemia-lymphoma)(Yoshida et al., 1982) et de nombreuses pathologies inflammatoires dont la plus importante en terme d'incidence est la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/ HAM) (Gessain et al., 1985).

## A. Épidémiologie

On estime à environ 5-10 millions le nombre de personnes actuellement porteuses du virus HTLV-1 à travers le monde (Gessain and Cassar, 2012). Cependant ces chiffres sont probablement sous-estimés du fait de l'absence d'études épidémiologiques systématiques dans une majorité des régions endémiques (Gessain and Cassar, 2012). HTLV-1 n'est pas un virus ubiquitaire. Il se caractérise par sa distribution géographique, il est retrouvé dans des zones de forte endémie virale telles que l'Afrique subsaharienne (Fox et al., 2016), l'Amérique du Sud, les Caraïbes, le nord de l'Iran (Salehi et al., 2017), le sud du Japon, l'Australie centrale (Einsiedel et al., 2016a, 2016b) et la Mélanésie (Yanagihara et al., 1990) (**Figure 1**). L'origine de cette répartition en foyers géographiques est encore mal comprise aujourd'hui mais pourrait être le reflet de l'apparition d'une primo-infection au sein d'un groupe particulier suivi de la persistance d'une transmission virale efficace liée à des conditions environnementales ou socio-culturelles favorables (Proietti et al., 2005; Rouet et al., 1999). L'infection par HTLV-1 se caractérise, en outre, par l'augmentation progressive de la séroprévalence avec l'âge (plus de 2% parmi la population globale adulte et dont 30 à 40% chez des personnes de plus de 50 ans au Sud du Japon), et selon le genre (plus élevée chez les femmes que chez les hommes) (Gessain and Cassar, 2012; Gonçalves et al., 2010).



**Figure 1 : Répartition géographique des principaux foyers d'infection du virus HTLV-1**

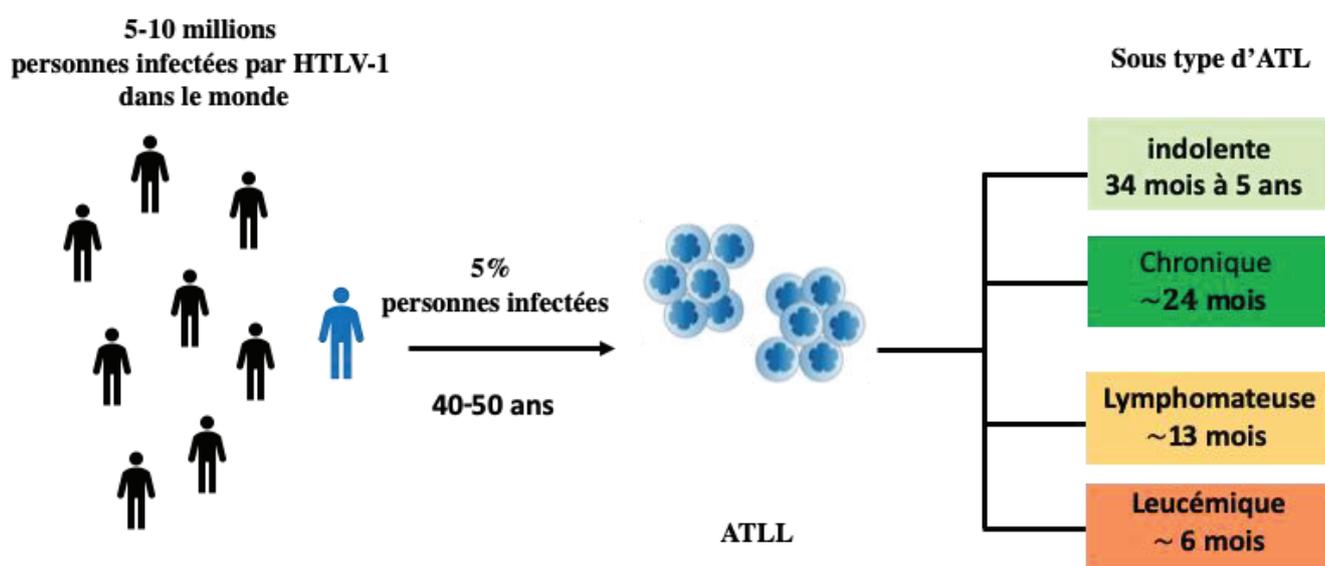
Estimation du nombre de personnes infectées par le HTLV-1 à l'échelle mondiale. Ces résultats sont basés sur des données épidémiologiques d'environ 1,5 million d'individus provenant d'études sur des femmes enceintes et/ou des donneurs de sang et/ou différentes populations adultes. Les foyers de prévalence sont symbolisés par les cercles violets et leur taille varie suivant leur importance. Le Japon et l'Afrique sont des régions endémiques majeures de l'infection par HTLV-1.

D'après (Gessain and Cassar, 2012).

## B. Les pathologies associées à HTLV-1 et les traitements

### 1. La leucémie T de l'adulte (ATL)

La leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte (ATL) est une maladie lymphoproliférative agressive induite à partir de lymphocytes T CD4+ infectés par le virus HTLV-1 (Ishitsuka and Tamura, 2014; Uchiyama et al., 1977). Trois à 5 % des sujets infectés par HTLV-1 développent une ATL après une latence prolongée de 40 à 60 ans, suite généralement à une contamination par l'allaitement maternel prolongée (Fujino and Nagata, 2000). L'ATL est subdivisée en quatre formes anatomo-cliniques : une forme leucémique aiguë, une forme leucémique chronique, une forme indolente et une forme lymphomateuse (Phillips and Harewood, 2018; Shimoyama, 1991) (Figure 2).



**Figure 2 : Développement de l'ATL**

5-10 millions de personnes sont infectées par le virus HTLV-1 dans le monde dont 5 % de la population développent une ATL. Le temps de survie en mois est dépendant du sous-type ATL. Figure adaptée de (Panfil et al., 2016)

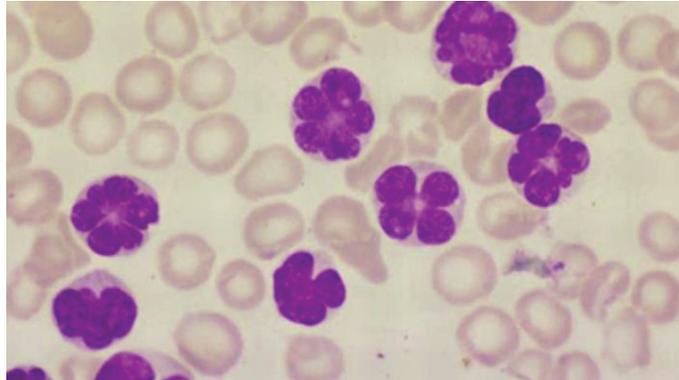
L'ATL aiguë se traduit, du point de vue clinique, par la survenue d'adénopathies périphériques, associées fréquemment à une hépatosplénomégalie, à une hypercalcémie et des lésions cutanées variées, entraînant un mauvais pronostic vital. Il existe également une hyperlymphocytose T, définie par la présence de nombreuses cellules leucémiques dans le sang périphérique des malades. Ces cellules correspondent à des lymphocytes T anormaux possédant un grand nombre de marqueurs d'activation à leur surface, ainsi qu'une morphologie interne atypique et parfaitement reconnaissable, en forme de trèfle (**Figure 3**). Cette morphologie s'explique par la présence d'un noyau convoluté, dans lequel la chromatine est condensée et où les nucléoles sont petits ou absents. Ces cellules malignes ont un phénotype CD3+ CD4+ CD5+ CD7- CD8- CD25+. Elles sont détectées dans le sang périphérique ou dans des biopsies d'organes infectés.

La forme lymphomateuse est aussi très agressive, avec une survie moyenne de 13 mois. Les critères cliniques sont identiques à ceux de la forme leucémique. Des cellules lymphomateuses envahissent les organes lymphoïdes et sont responsables d'un lymphome T à cellules pléomorphes.

Bien que très agressives, les formes chroniques et indolentes sont toutefois de meilleurs pronostics. La forme chronique est à évolution lente sans hypercalcémie, ni atteinte autre que ganglionnaire, hépatosplénique ou cutanée. La médiane de survie est de 24 mois. La forme indolente dite « *smoldering* » (5 %) peut progresser vers la forme chronique ou aiguë.

Les traitements actuels reposent pour l'essentiel sur la chimiothérapie et une thérapie antivirale de première intention, qui consiste en la combinaison de l'INF- $\alpha$  (inhibiteur du cycle viral de HTLV-1) et la Zidovudine (AZT, l'inhibiteur de transcriptase inverse). L'action synergique de IFN- $\alpha$ /AZT a montré des effets bénéfiques chez les patients développant les formes leucémiques, chroniques et indolentes d'ATL (Bazarbachi et al., 2010). Cependant, il n'existe aucun traitement efficace contre la forme lymphomateuse d'ATL pour laquelle les patients sont toujours soignés par chimiothérapie. Des stratégies d'allogreffes de cellules souches ont été

développées et donnent des résultats intéressants, y compris chez les patients atteints de formes aiguës ou lymphomateuses (Phillips et al., 2016).



**Figure 3 : Cellules en fleur (Flower cells)**

Morphologie typique des cellules tumorales présentes dans le sang périphérique des patients atteints d'ATL. Observation issue d'un frottis sanguin après coloration au May Grunwald-Giemsa.

## 2. La paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP) et les autres maladies inflammatoires associées à l'infection

La paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM, *Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy*) est une maladie inflammatoire chronique (Bangham et al., 2015). Elle touche essentiellement les adultes, et en particulier les femmes, avec une apparition des premiers signes cliniques vers 40-50 ans (Bangham et al., 2015). La TSP/HAM est surtout associée à la contamination par le biais de transfusions sanguines ou bien de relations sexuelles (Gessain and Mahieux, 2012). L'incidence de la TSP/HAM est un peu plus faible que celle de l'ATL puisque 0,25 à 3% des personnes infectées par HTLV-1 sont concernées (Iwasaki, 1993). La TSP/HAM est une méningomyélite chronique qui est associée à une démyélinisation et une dégénération axonale. Elle se caractérise par des infiltrations de cellules immunitaires dans la moelle épinière. Il a été également décrit que le cerveau et sa substance blanche peuvent être affectés par ces infiltrations inflammatoires (Hickey et al., 1991; Wekerle et al., 1986). Les stades précoces de la pathologie sont caractérisés par des infiltrations

correspondant principalement à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> puis par la suite les lymphocytes CD8<sup>+</sup> reprennent le dessus provoquant ainsi une atrophie de la moelle épinière (Bradl et al., 2005; Iwasaki, 1993). De façon intéressante, la charge provirale est un facteur de risque : celle des patients TSP/HAM est de 5 à 20 fois plus élevée que celle des porteurs sains. Une charge provirale élevée constitue un biomarqueur prédictif du risque de développer une maladie associée à HTLV-1. Par conséquent, la réduction drastique de la charge provirale constituerait une mesure préventive à l'apparition de maladies associées à l'infection. D'autres biomarqueurs semblent aussi jouer un rôle dans le développement de la pathologie. En effet, certains haplotypes HLA comme par exemple le HLA-A\*02 sont associés à un effet protecteur alors que les patients HLA-B\*5401 ont un risque accru de développer la maladie (Jeffery et al., 1999).

D'autres pathologies inflammatoires ont été associées à l'infection par HTLV-1 telles que des dermatites infectieuses, des uvéites, des myosites ou polymyosites. Cependant, il existe peu de données sur leur prévalence.

### C. Les modes de transmission du virus

HTLV-1 se transmet selon deux voies majeures, horizontale et verticale (Futsch et al., 2017) :

- La transmission verticale s'opère de la mère à l'enfant par un allaitement prolongé de plus de six mois (Wiktor et al., 1997).
- Une transmission horizontale passe par contact sexuel, avec une transmission préférentielle, mais non exclusive, dans le sens homme-femme (Paiva and Casseb, 2014). Le virus HTLV-1 se transmet également par voie sanguine lors de transfusion de composés sanguins contenant des lymphocytes T infectés (Inaba et al., 1999).

La transmission verticale est la plus efficace pour le virus HTLV-1 car elle repose sur une exposition répétée à la source de l'infection (Alvarez et al., 2016). Ceci explique en partie une prévalence locale. En effet, les foyers de forte endémie du virus HTLV-1 sont souvent constitués de groupes de populations ayant vécu de façon assez isolée durant de longues périodes. Cependant, la mobilité croissante de la population conduit à l'apparition plus fréquente d'infections associées à HTLV-1 dans les régions non-endémiques du Japon (Yoshida and

Chihara, 2015), du Brésil (Bandeira et al., 2015) et d'Europe (Gessain et al., 2015). L'optimisation et le développement des stratégies de détection et de prévention constituent dorénavant un enjeu majeur pour contrer l'apparition de nouveaux foyers infectieux.

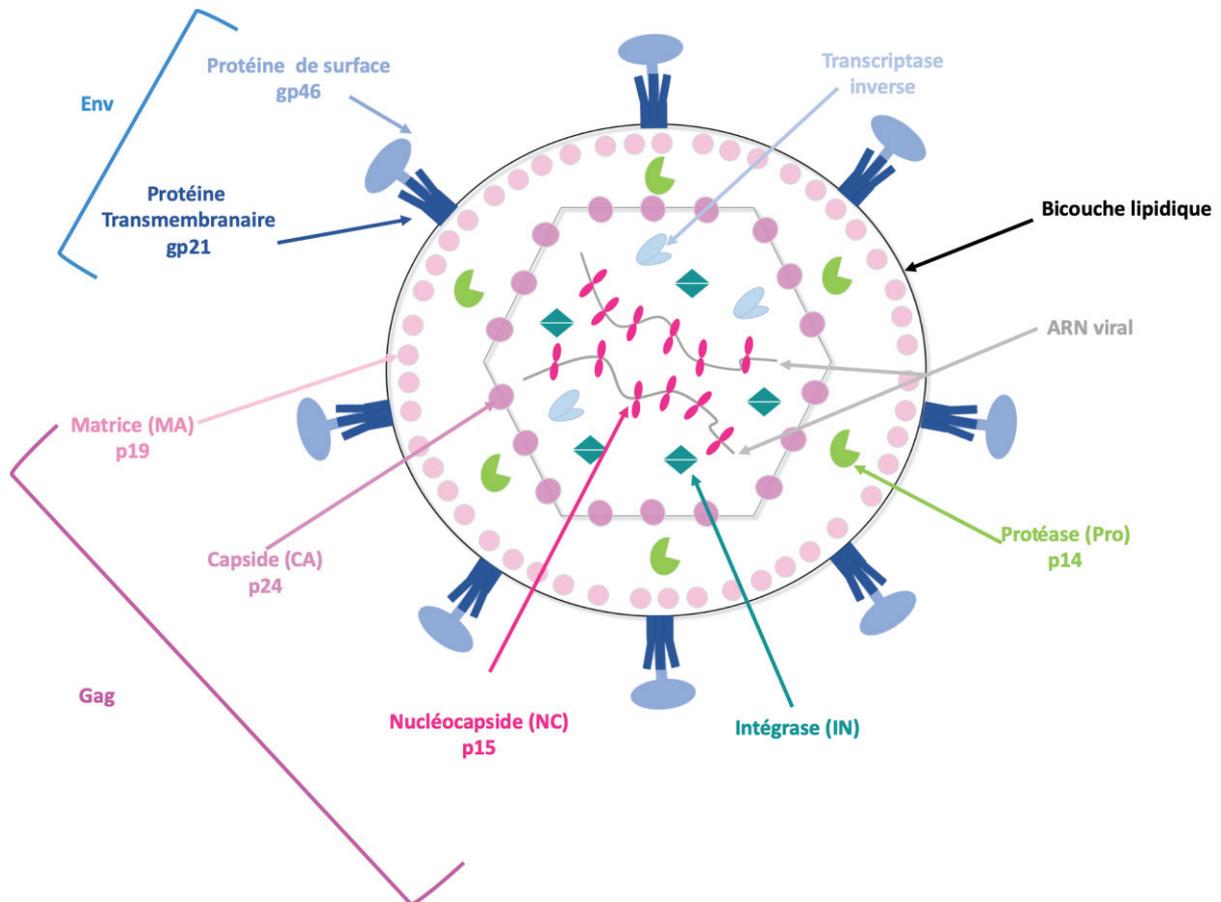
## II. Stratégie infectieuse du virus HTLV-1

Comme tous les rétrovirus, le virus HTLV-1 possède un cycle de réplication composé de deux phases principales : (i) une phase dite précoce qui correspond à l'entrée du virus, sa reverse transcription et l'intégration du génome au sein de l'ADN génomique de l'hôte, et (ii) une phase tardive, dépendante de la machinerie cellulaire, qui vise à transcrire le génome proviral et produire l'ARN génomique viral ainsi que les ARNm codant les protéines virales.

### A. Structure du virus HTLV-1

#### 1. La particule virale

Le virion possède une enveloppe d'origine cellulaire qui est emportée par la particule virale lors de son bourgeonnement à la membrane plasmique (**Figure 4**). Elle se compose d'une bicouche phospholipidique associée aux glycoprotéines virales gp46 (sous-unité de surface), et gp21 (sous-unité transmembranaire). Cette enveloppe est associée à une couche de protéines de matrice p19. Ces dernières sont capables de s'homodimériser et de s'organiser en hexamères, afin d'ancrer les glycoprotéines transmembranaires gp21 de l'enveloppe virale au centre de ces structures (Rayne et al., 2004; Verdonck et al., 2007). Les protéines de matrice participent à l'assemblage des virions sous la membrane plasmique et établissent un véritable lien entre l'enveloppe et la capsid. Constituée de protéines p24, cette capsid icosaédrique renferme le complexe ribonucléo-protéique : deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive, associées aux protéines de la nucléocapsid (p15) et aux protéines virales (Verdonck et al., 2007).

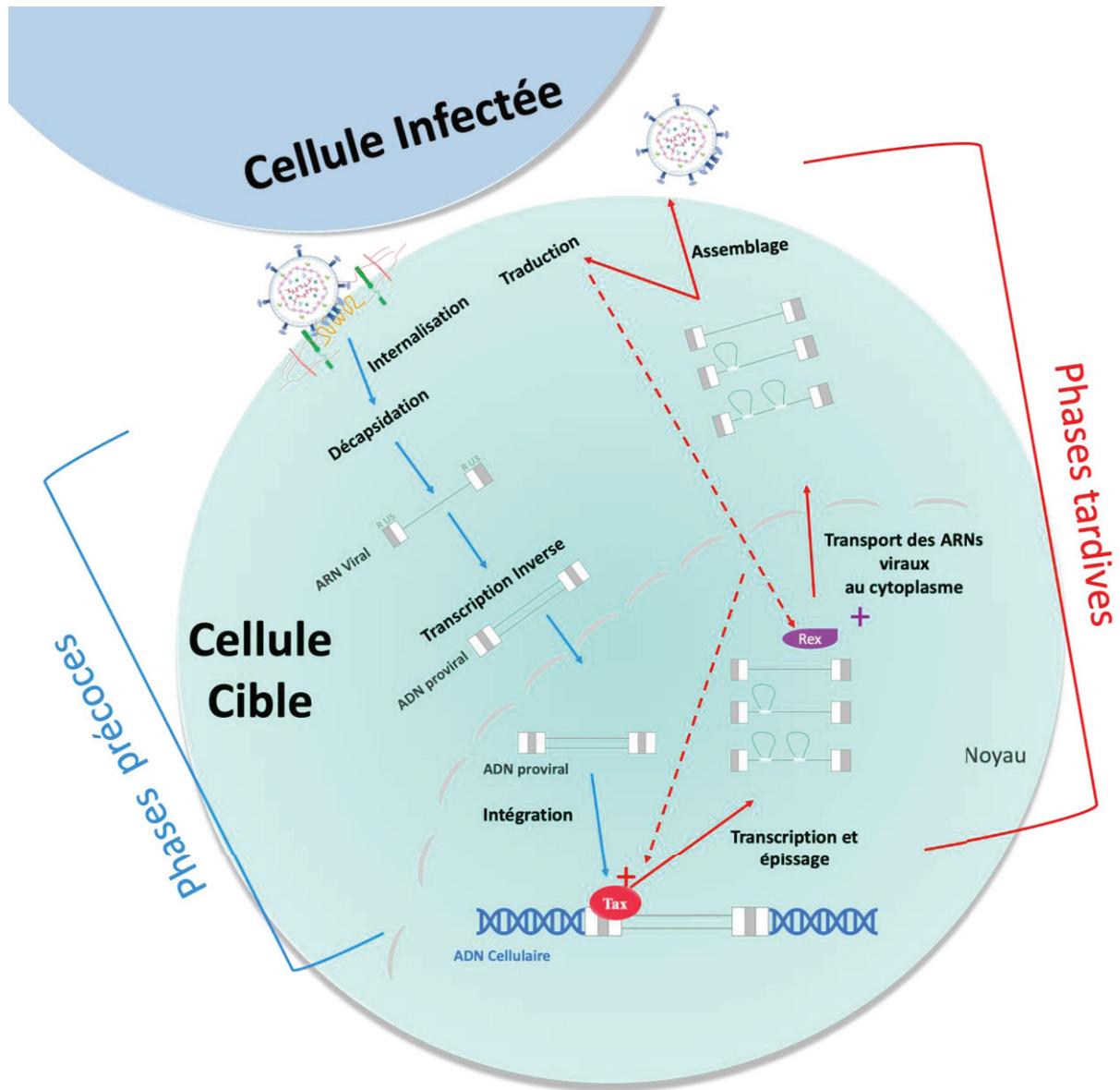


**Figure 4 : Représentation schématique du virion d'HTLV-1 et de ses protéines virales**

## 2. Le génome viral et le cycle répliatif par reverse-transcription

Le génome d'HTLV-1 est sous la forme de deux copies d'ARN simple brin de 8,5kb chacune, coiffées en 5' et polyadénylées en 3' (Seiki et al., 1983). Comme tous les rétrovirus, il comporte les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* qui codent des protéines nécessaires à la formation de particules virales infectieuses. HTLV-1 appartient aux rétrovirus complexes comportant une région supplémentaire codant des protéines dites auxiliaires ou régulatrices de la répliation du virus. Cette région dénommée pX pour HTLV-1 code les protéines Tax, Rex et HBZ, p12<sup>I</sup>, p13<sup>II</sup>, et p30<sup>III</sup>. Au cours de la phase précoce de l'infection, le génome viral ARN subit une étape de transcription inverse pour synthétiser une molécule d'ADN bicaténaire qui sera intégrée dans le génome de la cellule hôte (forme provirale). Le génome proviral se trouve ainsi flanqué, en

5' et en 3', de 2 LTRs (pour Long Terminal Repeat) en tandem. Composées de séquences répétées U5, R et U3 ces séquences contiennent notamment les promoteurs viraux et les sites de terminaison de la transcription et de polyadénylation des ARN viraux.



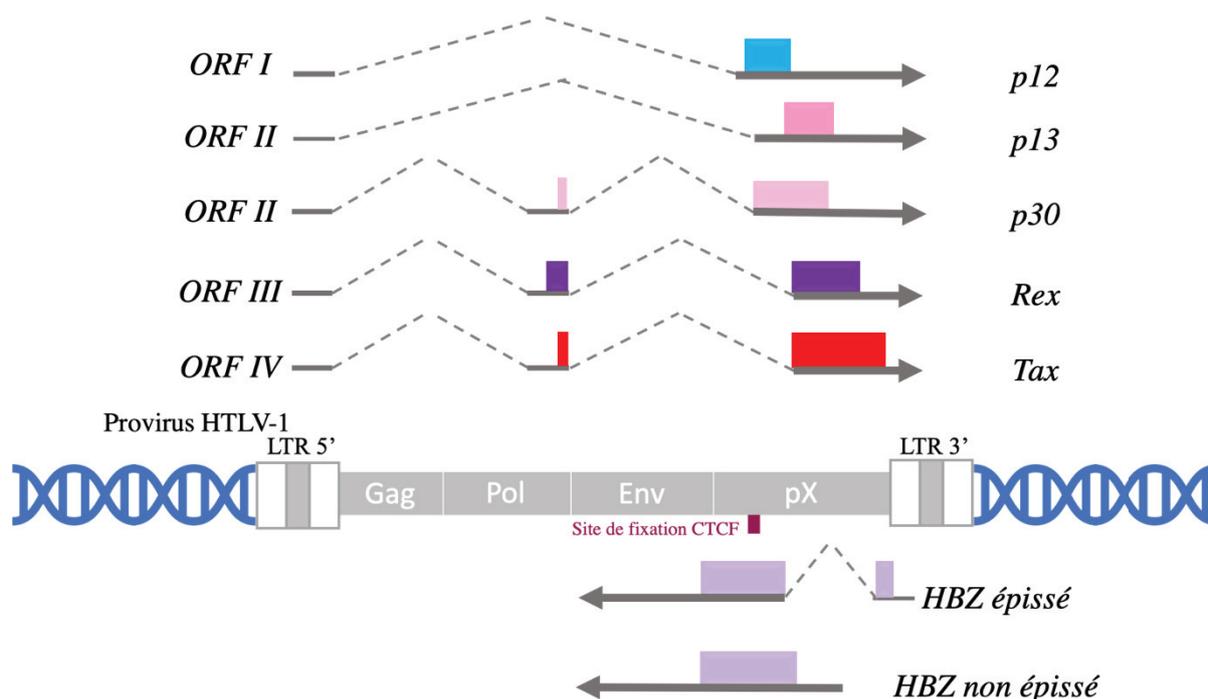
**Figure 5 : Cycle réplcatif du virus HTLV-1**

Les étapes précoces correspondent à l'entrée du HTLV-1 dans les cellules cibles, par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, suivie de la décapsidation du virus et de la transcription inverse de son ARN génomique en ADN double brin, capable de s'intégrer dans le génome cellulaire (flèches bleues). Les étapes tardives comprennent la transcription de l'ADN proviral permettant la synthèse des facteurs viraux et l'assemblage des nouvelles particules virales sous la membrane plasmique. A noter que la réplcation du virus nécessite des cellules en division. Les nouveaux virions émergent alors des cellules par bourgeonnement et leur maturation permet de former de nouvelles particules infectieuses du virus HTLV-1 (flèches rouges).

### 3. Les protéines virales

#### a) Les protéines de structure et les enzymes virales

Les protéines Gag, Pro et Pol sont produites à partir d'ARNm viraux non-épissés (**Figure 6**). Des décalages du cadre de lecture successifs aboutissent à la synthèse des trois précurseurs polyprotéiques Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol (Lairmore and Franchini, 2007). Le clivage de Gag produit la protéine de matrice p19, de capsid p24 et de nucléocapsid p15 (Le Blanc et al., 2001). Les protéines de structure p19, p24 et p15, ainsi que celle de la protéase virale (Pro) sont obtenus par le clivage du précurseur Gag-Pro. Le précurseur Gag-Pro-Pol permet la production de la transcriptase inverse et de l'intégrase. La protéine Env (gp62) sera traduite à partir d'un ARNm mono-épissé. Les glycoprotéines transmembranaires (gp21) et de surface (gp46) seront libérées à la suite du clivage de la protéine Env.



**Figure 6 : Structure du génome du virus HTLV-1**

Le rétrovirus HTLV-1 est composé des gènes gag, pol et env qui codent les protéines de structures et enzymatiques. La région pX code pour les protéines dites auxiliaires Tax, Rex, p12, p13 et p30 sont transcrites à partir du brin plus du provirus. La protéine HBZ est transcrite à partir du LTR 3' en antisens de Tax. D'après (Bangham and Matsuoka, 2017).

## b) Les protéines auxiliaires et régulatrices

La région pX du provirus se compose de 4 cadres ouverts de lecture (ORF, *Open Reading Frame*) et produit 6 protéines régulatrices via des mécanismes d'épissage alternatif des ARN et la présence de plusieurs codons internes d'initiation de la traduction (**Figure 6**).

L'ORF I, produit à partir d'un ARNm mono-épissé, code la protéine auxiliaire p12 qui peut, par la suite, être clivée dans sa partie N-terminale pour générer une nouvelle protéine appelée p8. Les protéines auxiliaires p13 et p30 sont codées par l'ORF II à partir de deux ARNm aux épissages alternatifs différents : l'ARNm mono-épissé produit p13 alors que la forme doublement épissée donne p30.

Les protéines p12, p8, p13 et p30 dites auxiliaires ont été montrées comme étant nécessaires pour le pouvoir infectieux et la persistance du HTLV-1 (Bai and Nicot, 2012; Pique et al., 2000). *In vivo*, elles participent à la protection des lymphocytes T infectés de l'apoptose tout en favorisant leur prolifération ou encore, en favorisant l'établissement de la latence virale (Edwards et al., 2011).

Les ORF III et IV, produits à partir d'un ARNm doublement épissé, codent respectivement les protéines régulatrices Rex et Tax. L'ORF IV a l'originalité de transcrire l'ARN codant pour la protéine HBZ en anti-sens, à partir du LTR 3' (Gaudray et al., 2002). Deux isoformes protéiques d'HBZ sont traduites à partir d'un ARNm épissé ou non. L'isoforme la plus abondante est celle de 206 acides aminés codée par le transcrit épissé (Yoshida et al., 2008). Les protéines régulatrices Tax, Rex jouent un rôle essentiel dans l'expression et la réplication *in vitro* et *in vivo*.

## B. Les étapes majeures de l'infection

### 1. Les cellules cibles

*In vivo*, l'ADN proviral du virus HTLV-1, est principalement présent dans les cellules T CD4+ activées et les cellules T CD8+ (Richardson et al., 1990). L'analyse précise des lymphocytes T CD4+ infectés par HTLV-1 a permis de déterminer que le virus cible préférentiellement les CD4+ activés, aussi appelés effecteurs, exprimant entre autres le marqueur CD25 (Yamano et al., 2004). D'autre part, le tropisme du virus HTLV-1 pour certaines sous-populations de lymphocytes T CD4+ *in vivo* a pu être détaillé. Notamment, les cellules T activées mémoires, caractérisées par le marqueur CD45<sup>RO</sup> (Richardson et al., 1990) et les lymphocytes T CD4+, correspondant aux cellules T régulatrices (T-reg) ont ainsi été identifiées comme des cellules cibles d'HTLV-1. Par ailleurs, cette dernière population T CD4+ infectée exprime FoxP3 (*Forkhead box P3*), un facteur de transcription spécifique aux lymphocytes T régulateurs (Satou et al., 2012).

Dans une moindre mesure, l'ADN proviral a été détecté dans d'autres cellules du système immunitaire, y compris les cellules B, les monocytes ou encore les cellules dendritiques (Koyanagi et al., 1993; Macatonia et al., 1992; Nagai et al., 2001). Une étude indique que le virus HTLV-1 n'infecte pas les cellules souches hématopoïétiques (HSC) chez les patients ATL (Nagafuji et al., 1993). Une étude plus récente montre qu'un grand nombre de types cellulaires hématopoïétiques partagent les mêmes sites d'intégration suggérant que ces cellules dérivent de la prolifération et de la différenciation d'un unique précurseur hématopoïétique infecté (Furuta et al., 2017).

En conclusion *in vitro*, le virus HTLV-1 peut infecter un large spectre de cellules T et B, des cellules dendritiques, des monocytes, et des cellules endothéliales, gliales et épithéliales. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des récepteurs du virus à la surface de ces cellules.

## 2. Les récepteurs viraux

La reconnaissance des cellules cibles et la fixation des particules virales à leur surface sont des événements cruciaux pour l'entrée du virus (Gross and Thoma-Kress, 2016; Pique and Jones, 2012). Les protéines de l'enveloppe du virus HTLV-1 interagissent avec 3 récepteurs membranaires : le transporteur de glucose 1 (GLUT-1) (Manel et al., 2003), NRP-1 (*Neuropilin-1*) (Ghez et al., 2006) et HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) (Jones et al., 2005). GLUT-1 et HSPG sont exprimés dans une grande diversité de types cellulaires contrairement à la NRP-1 qui est exprimée au niveau des cellules endothéliales, des cellules dendritiques et des lymphocytes T activés. Ces trois molécules coopèrent pour fixer la sous-unité SU des glycoprotéines de l'enveloppe virale et permettre l'entrée du virus. La formation de ce complexe SU/HSPG/NRP-1 induirait un changement de conformation de la sous-unité virale, favorisant la liaison de SU avec le transporteur GLUT1. Cette liaison entre SU et GLUT1 permet finalement la fusion des membranes, via l'insertion du peptide de fusion de la sous-unité TM des glycoprotéines d'enveloppe virale dans la membrane plasmique cellulaire (Pique and Jones, 2012). À la suite de cette fusion, la capsid virale entre dans le cytoplasme cellulaire.

## 3. Transmission cellule-cellule

Le virus HTLV-1 libre étant faiblement infectieux, sa transmission dépend de contacts cellulaires étroits. Cette transmission cellule à cellule des virions HTLV-1 repose sur trois voies moléculaires non exclusives : la synapse virologique, le biofilm viral et les conduits viro-induits (Gross and Thoma-Kress, 2016; Pique and Jones, 2012).

### a) *La synapse virologique*

La synapse virologique est la mise en place d'un espace privilégié entre deux cellules CD4+ et/ou un lymphocyte CD4+ et une cellule CD8+ (Igakura et al., 2003). Elle est associée à une accumulation des protéines Gag et Env à la jonction entre la cellule infectée et la cellule cible.

L'établissement et la stabilisation de cette synapse nécessitent l'interaction de divers facteurs et notamment, les facteurs I-CAM (pour IntraCellular Interaction Molecule) (Chevalier et al., 2012; Mori et al., 1994), V-CAM (pour Vascular Cell Adhesion Molecule), LFA-1 (pour Lymphocyte Function-associated Antigen) (Nejmeddine and Bangham, 2010) et le centre organisateur des microtubules (MTOC) (Nejmeddine et al., 2005). Ce processus est dépendant de Tax : son expression constitue un signal intracellulaire et extracellulaire en favorisant l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface des cellules infectées. L'action synergique de ces deux signaux permet la réorientation du MTOC au point de contact lors de la formation de la synapse virologique (Nejmeddine et al., 2009). Les particules virales relarguées dans la synapse peuvent infecter la cellule voisine (**Figure 7**).

### *b) Biofilm viral*

Le biofilm viral est une structure qui permet la rétention des particules virales à la surface des cellules infectées (Pais-Correia et al., 2010). Il est composé essentiellement de Galétine 3, d'Aggrine, d'Intégrine, de Glycoside complexe et de Tétherine qui est impliquée dans la rétention des virions. Le biofilm chargé de particules virales se transmet assez facilement, un contact éphémère suffit. Il contribue au pouvoir infectieux de façon non négligeable. Le décrochage du biofilm par des lavages successifs ou par traitement à l'héparine réduit de plus de 80% le taux d'infection *in vitro* (**Figure 7**).

### *c) Les conduits viro-induits*

Les cellules infectées par HTLV-1 présentent également à leur surface des protrusions tubulaires appelées conduits (Van Prooyen et al., 2010). Ces expansions membranaires sont formées *de novo* par la cellule et participeraient à la stabilité des contacts cellules-cellules mais également à des échanges de protéines cytoplasmiques. Le transfert de p8 a été mis en évidence dans le contexte d'une infection par HTLV-1. Elle permet de contrôler la réponse immune en diminuant la signalisation via le TCR et l'expression du CMH-1. L'expression de p8 dans la cellule cible augmente l'expression de LFA-1. L'interaction entre ICAM-1 et LFA-1 est au

cœur des mécanismes de formation de conjugués participant à l'établissement de la synapse virologique et à l'entrée du virus dans la cellule cible (Figure 7).

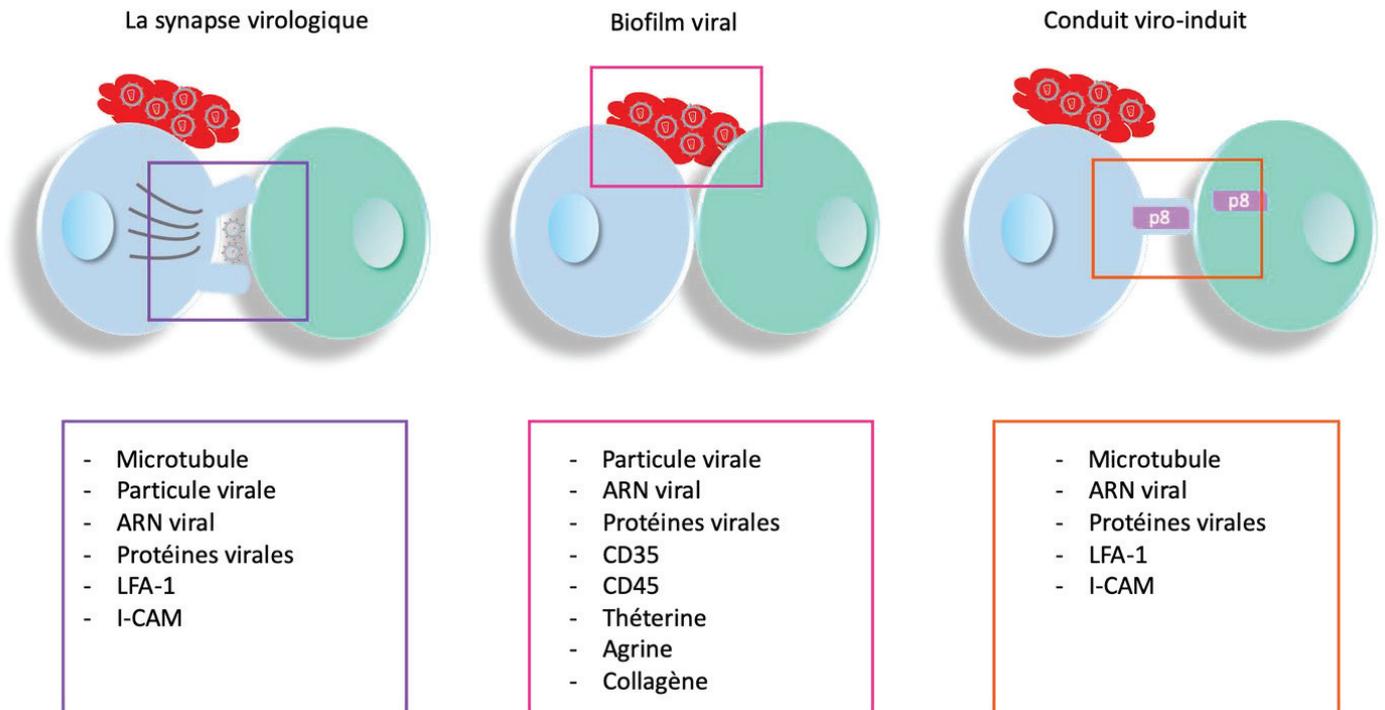


Figure 7 : Schéma des trois modes de transmission du virus HTLV-1

## C. Réplication par expansion clonale

Le mode de réplication d'HTLV-1 *in vivo* repose essentiellement sur l'expansion clonale de sa cellule hôte (Bangham, 2018; Watanabe, 2017; Wattel et al., 1996). Ce mode d'expansion du virus permet d'expliquer la faible variabilité génétique du HTLV-1 *in vivo* alors que le taux d'erreur d'incorporation de nucléotides généré par sa reverse transcriptase est sensiblement identique à celui des autres rétrovirus (Mansky, 2000). La séquence provirale au cours de la mitose bénéficie de la grande fidélité de réplication de la machinerie cellulaire. Toutefois, il a été montré que les cellules infectées prolifèrent dans un contexte d'instabilité génomique qui participe à la variabilité du génome viral (Mortreux et al., 2001). Ce mode de réplication a pu être caractérisé par la mise en place des technologies PCR inverse (IPCR) et de PCR avec ligation d'oligonucléotides (LMPCR) (Mortreux et al., 2001). Ces techniques ont démontré la présence d'un très grand nombre de clones cellulaires (chacun issu d'un événement unique d'intégration du provirus et donc caractérisé par un seul et même site d'intégration du virus) dans le sang périphérique des patients infectés par HTLV-1. Les clones cellulaires infectés peuvent persister des années après la primo-infection. Le nombre et l'ampleur des clones infectés semblent corrélés au statut clinique des patients (Shimoyama, 1991; Yoshida et al., 1984). Il a été également observé que les contaminations horizontales du virus aboutissent à la génération de clones plus hétérogènes et moins stables que ceux détectés chez les patients infectés via l'allaitement maternel (Okayama et al., 2001; Tanaka et al., 2005). Une réplication oligo/polyclonale des cellules infectées est associée aux stades asymptomatique et TSP/HAM, alors que les patients ATL présentent un profil monoclonal composé essentiellement du clone tumoral majoritaire (représentant jusqu'à 90% ou plus de la charge provirale) accompagné de formes minoritaires de très faible ampleur (Meekings et al., 2008). Par les méthodes de séquençage profond, l'équipe de Charles Bangham a confirmé ces données et observé la présence de 10 000 à 100 000 intégrants uniques dans le sang périphérique des individus infectés par HTLV-1 (Cook et al., 2012; Gillet et al., 2011)

La plupart des cellules infectées par HTLV-1 comportent une seule copie du provirus dont l'intégration du génome viral n'est pas totalement aléatoire (Cook et al., 2012). Elle apparaît préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives (Gillet et al., 2011), au

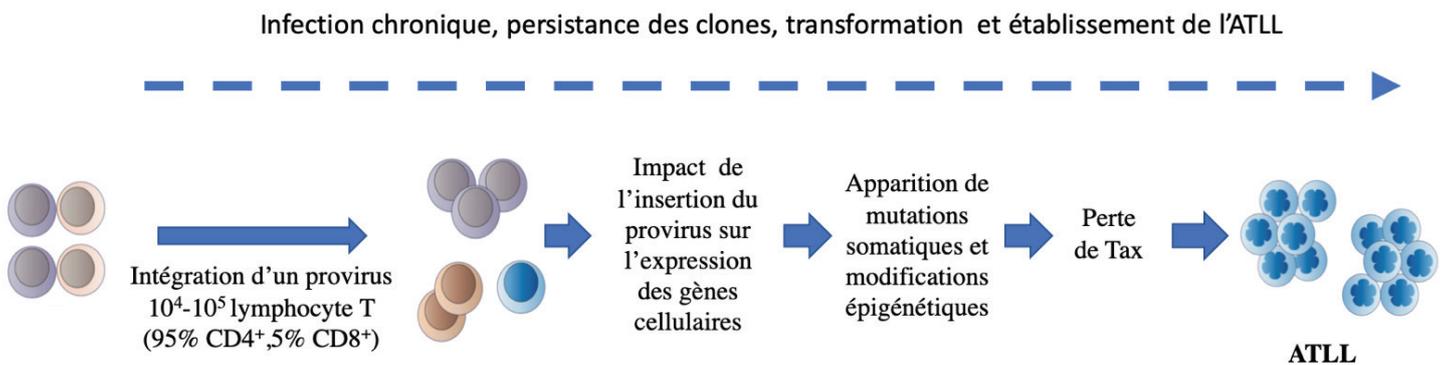
niveau d'un motif consensus non palindromique (AATTAAAGTGGAT | ATCCACTTAAATA) (Kirk et al., 2016). L'intégration du virus dans des régions proches de proto-oncogènes cellulaires tels que STAT1, HDAC6, et TP53 (Melamed et al., 2013) semble être associée à un avantage sélectif pour la survie des clones de lymphocytes activés *in vivo* sans pour autant jouer un rôle significatif dans l'oncogenèse (Cook et al., 2014)(Rosewick et al., 2017a).

L'expansion clonale des cellules infectées a été observée dans les répertoires T CD4+ et CD8+ (Sibon et al., 2006). Deux mécanismes distincts ont été décrits : HTLV-1 induit l'activation du cycle cellulaire dans les lymphocytes T CD4+ *in vivo* alors qu'il inhibe l'apoptose des cellules T CD8+ infectées *in vivo* et *in vitro*. Cette inhibition de la mort des cellules T CD8+ infectées a été reliée à la surexpression du gène anti-apoptotique c-IAP2 (cellular Inhibitor of Apoptosis 2), via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax (Zane et al., 2010) .

Cette propagation du virus HTLV-1 par expansion clonale permet la persistance de l'infection et la transformation des cellules infectées (**Figure 8**). Les cellules T CD4+ infectées prolifèrent dans un contexte d'instabilité génomique générée par Tax et HBZ (**voir Chapitre II partie F**) qui favorise la survenue de dommages clastogéniques et l'aneuploïdie. L'analyse de données large échelle met en évidence la présence de mutations somatiques récurrentes et des réarrangements chromosomiques qui confèrent un avantage sélectif aux cellules issus de patients ATL. Les mutations sont fréquemment retrouvées au sein des gènes CDKN2A, CD58, CCR4, TP53, TET2 et MLL3. De plus, l'étude de Kataoka *et al.* montre que 10% des ATL, présentent des mutations dites activatrices de l'expression des gènes au niveau de neuf des treize mutations étudiées. Ces altérations sont notamment associées à la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et aux régulations transcriptionnelle et épigénétique régulées par Tax (Kataoka et al., 2015). Le rôle majeur de Tax dans ces mécanismes permettant la transformation cellulaire seront développés ultérieurement.

L'oncoprotéine Tax est rarement exprimée dans les cellules d'ATL. L'ARNm de Tax n'est retrouvée que dans 14/41 ATL par RT-qPCR (Takeda et al., 2004) (**Figure 8**). Par RNA-seq, seul 1/50 ATL a été détecté positif pour Tax dans une étude récente (Kataoka et al., 2015). La perte de l'expression de Tax au stade tumoral repose sur divers mécanismes : l'hyperméthylation ou

la délétion du LTR 5' et des mutations au sein de la séquence codante de Tax aboutissant à l'apparition d'un codon STOP prématuré (Takeda et al., 2004). L'hyperméthylation du LTR5' est décrite comme étant un évènement réversible, notamment via un traitement à la 5-Aza-2'-deoxycytidine, un analogue structural de la cytidine qui ne peut pas être méthylé dans des lignées cellulaires dérivées d'ATL (TL-Om1, MT-1). Par ailleurs, un travail récent montre que les cellules de lignées cellulaires issues d'ATL sont capable de réactiver de manière transitoire l'expression de Tax (Mahgoub et al., 2018). Pour cela, Maghoub et al., ont développé un système d'expression de la d2GFP sous le contrôle de de 18 copies d'élément de réponse à Tax (TxRE) dans deux types de lignées cellulaires dérivées d'ATL, MT-1 et KK-1 (Mahgoub et al., 2018). Les auteurs montrent que 0,05 à 3% des cellules de ces lignées d'ATL, à l'origine silencieuse pour Tax, sont capables de réactiver de façon transitoire une expression de Tax. Ce phénomène semble apparaitre au dépend de l'expression d'HBZ. Le groupe de Charles Bangham confirme ce mode d'expression en « burst » de Tax et d'HBZ par des approches « single molecule RNA-FISH » dans des clones de cellules T issus de patients infectés par le virus HTLV-1 (Billman et al., 2017). Dans les cellules d'ATL, l'inhibition de l'expression de Tax induit l'entrée en apoptose des cellules MT-1, indiquant l'importance d'un maintien de l'expression de Tax pour la survie des cellules tumorales (Mahgoub et al., 2018).



**Figure 8 : Modèle des étapes de l'infection induite par HTLV-1 conduisant au développement de l'ATL**

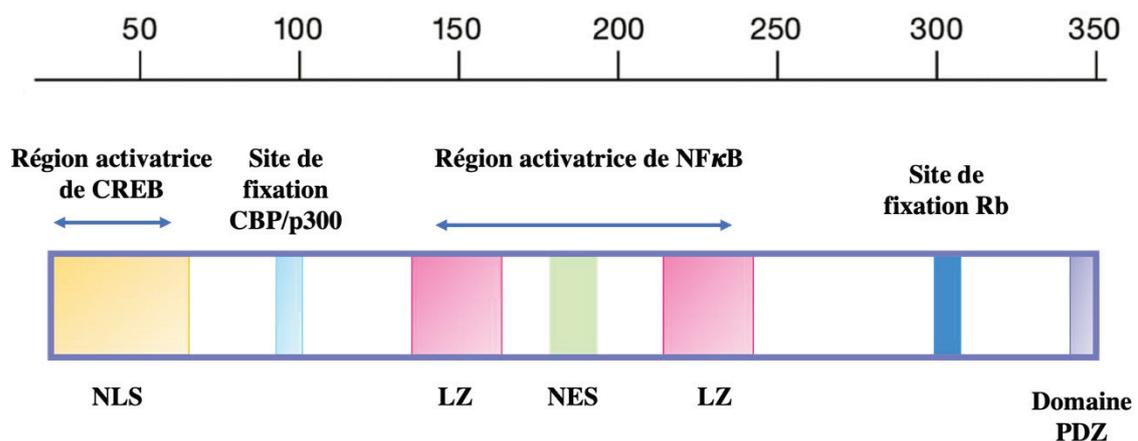
Au cours de l'infection par le virus HTLV-1, on observe la présence de nombreux clones distincts dans le sang des patients infectés. L'expression de facteurs viraux Tax et HBZ dérègle les principales voies cellulaires et favorise l'instabilité génétique conduisant ainsi à la prolifération incontrôlée des clones. L'accumulation des mutations somatiques ainsi que le remodelage épigénétique réalisés entraînent la transformation et l'émergence d'un clone majoritaire favorisant ainsi l'établissement de l'ATL. *Adapté de (Cook et al., 2017).*

## D. Régulation de l'expression des gènes viraux

### 1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de Tax

Tax est une protéine de 40 kDa hautement conservée. Elle est composée de plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 9**) :

- un signal de localisation nucléaire (NLS) qui est également la région d'activation des facteurs CREB
- le motif en doigt de zinc indispensable à son interaction avec les facteurs CREB et CBP/p300 en N-terminale
- deux régions en leucine zipper nécessaires à son interaction avec NEMO participant à l'activation de la voie NFκB
- un signal d'export nucléaire (NES)
- un motif de liaison aux domaines PDZ en C-terminale. Les domaines PDZ sont retrouvés dans de nombreuses protéines cellulaires, dont le suppresseur de tumeur Dlg ou la protéine MAGI-3, qui coopèrent avec PTEN pour inhiber la voie PI3K-Akt (Cherian et al., 2015).



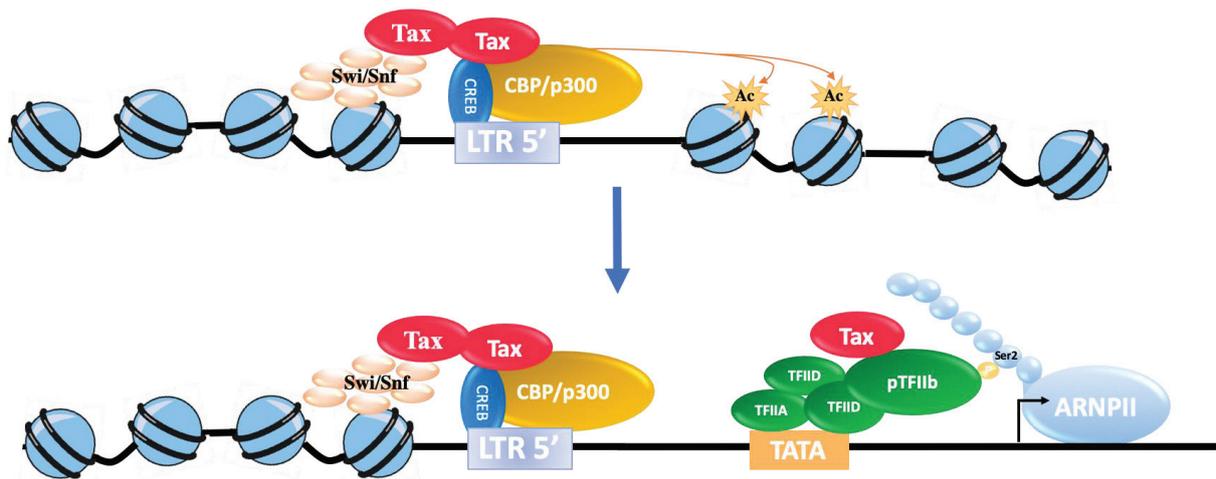
**Figure 9 : Schéma de la structure et des domaines fonctionnels de Tax**

NLS : Nuclear localisation signal, LZ : Domaine leucine zipper, NES : Nuclear exportation signal.

Ces domaines lui permettent d'interagir avec un large panel de partenaires cellulaires via notamment le domaine PDZ. Les interactants de Tax sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires (NF- $\kappa$ B, CREB, CBP/p300). Tax comporte des séquences d'adressage NLS et NES facilitant ainsi sa translocation dynamique et bidirectionnelle entre le noyau et le cytoplasme (Bertazzoni et al., 2011). Cette oncoprotéine n'est pas distribuée de façon homogène dans la cellule, elle s'organise essentiellement sous forme de structures spécifiques et importantes pour ses fonctions. Dans le cytoplasme, Tax est retrouvée au niveau des rafts lipidiques de l'appareil de Golgi ainsi que sous forme de granules en périphérie du noyau. Au niveau du noyau, Tax s'organise sous forme de granules (Tax bodies) où sont retrouvées de nombreuses protéines appartenant entre autres aux machineries de transcription, d'épissage, de réparation des dommages à l'ADN ou encore de réplication (Bex et al., 1997; Semmes and Jeang, 1996).

## 2. Tax active l'expression virale

Tax est impliquée dans la transactivation de l'expression des gènes viraux à partir du promoteur situé dans le LTR 5' (Felber et al., 1985) (**Figure 10**). Tax n'est pas capable de se fixer directement sur ces boîtes CRE mais recrute les facteurs ATF/CREB au niveau des sites TXRE pour Tax Responsive Element (qui contient une séquence CRE-like (vCRE) encadré par deux séquences riches en GC) du LTR en recrutant ainsi les histones acétyltransférases telles que CBP et p300, décondensant la chromatine et facilitant le recrutement de la machinerie de transcription pour induire l'expression des gènes viraux (Giam and Xu, 1989)(Lu et al., 2002). Tax est également capable d'influencer l'étape d'élongation de la transcription en entrant notamment en compétition avec Brd4 pour la fixation de la cycline T1 et l'activation du complexe pTEFb. Tax induit également, de manière indirecte la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II et favorise ainsi l'initiation de l'élongation transcriptionnelle (Cho et al., 2007; Zhou et al., 2006). Aussi, l'interaction entre Tax et BRG1 du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non Fermentable) facilite l'élongation transcriptionnelle *via* le remodelage des nucléosomes (Wu et al., 2004). L'ensemble des actions de Tax participe donc à sa propre expression ainsi qu'à l'expression des gènes du provirus.



**Figure 10 : Modèle de transactivation du LTR 5' par Tax**

La transactivation du LTR 5' viral Tax dépendant de nombreuses interactions fonctionnelles qui induisent des modifications épigénétiques. Tax recrute CREB/ATF et CBP/p300 conduisant à l'acétylation (Ac) des histones au niveau du promoteur viral. Les complexes SWI/SNF sont également recrutés par Tax. Tax impacte aussi la vitesse d'élongation de la polymérase II via son interaction pTEFb. Tax/pTEFb phosphoryle le domaine CTD au niveau de la Serine 2 aboutissant ainsi à l'activation de la transcription. D'après (Boxus et al., 2008).

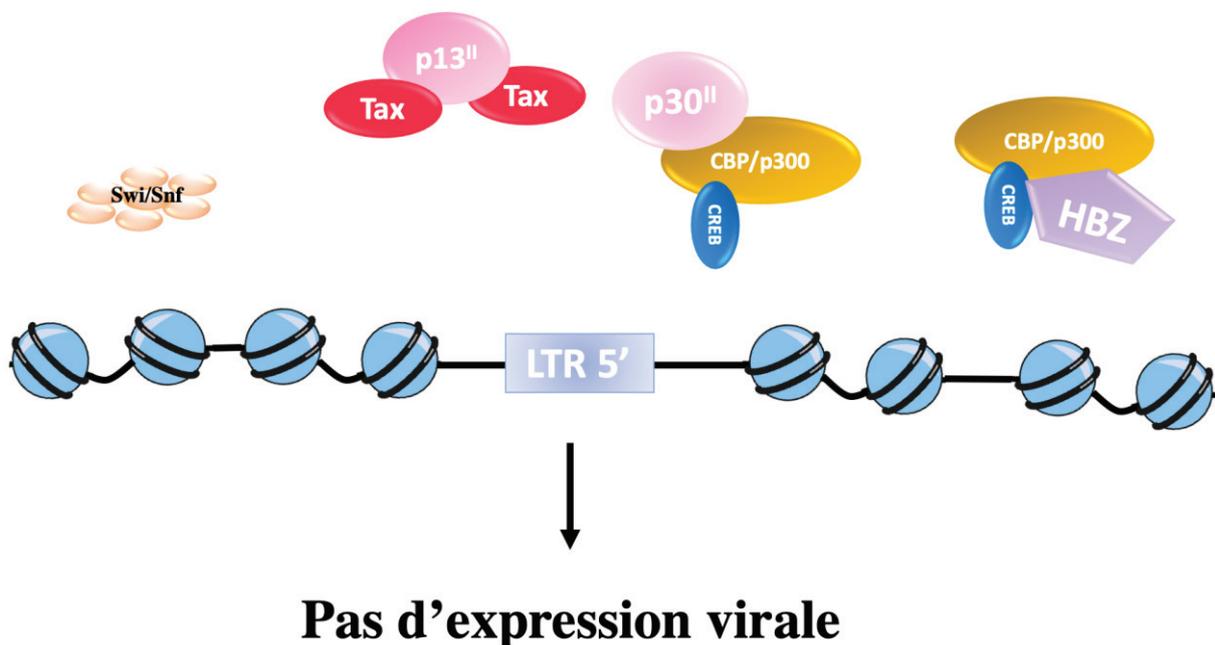
### 3. Rex, p13<sup>h</sup>, p30<sup>h</sup>, et HBZ, des trans-inhibiteurs de l'expression des gènes viraux

#### a) Rex

Rex (p21) est le régulateur post-transcriptionnel du virus HTLV-1. Il est produit à partir de l'ORF IV (**Figure 6**). L'activation du provirus HTLV-1 par Tax entraîne l'accumulation progressive de Rex qui favorise l'export des ARN viraux génomiques et codants les protéines de structure de particules virales (**Figure 5**). En effet, la protéine Rex interagit directement avec une structure particulière en 3' appelée RxRE présente uniquement sur les ARNs non épissés et partiellement épissés. L'export actif de ces ARNm viraux vers le cytoplasme médié par Rex permet la production des protéines de structure virale Gag, Pro, Pol et Env et la formation des particules virales (Heger et al., 1999; Hidaka et al., 1988).

## b) p13<sup>ll</sup> et p30<sup>ll</sup>

Les protéines p13<sup>ll</sup> et p30<sup>ll</sup> sont produites à partir de l'ORF II (**Figure 6**). Les protéines p30<sup>ll</sup> et p13<sup>ll</sup> participent à la latence virale en inhibant la transcription virale médiée par Tax. Les protéines p30<sup>ll</sup> et p13<sup>ll</sup> inhibent également la formation du complexe Tax-CBP/p300 (Andresen et al., 2011)(Zhang et al., 2001) (**Figure 11**). La protéine p30<sup>ll</sup> séquestre par ailleurs les ARNm viraux codant Rex et Tax dans le noyau, inhibant leur traduction dans le cytoplasme (Nicot et al., 2004).



**Figure 11 : Modèle d'inhibition de l'expression du génome viral**

Les protéines p13<sup>ll</sup>, p30<sup>ll</sup> et HBZ favorise l'inhibition de l'expression sens du génome viral en séquestrant Tax ou bien ses partenaires essentiels à la transactivation du LTR 5'.

### c) HBZ

La protéine HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor) est l'unique facteur viral produit par un ARN antisens synthétisé à partir du LTR 3' (Gaudray et al., 2002) (**Figure 6**). L'isoforme épissée de ce transcrit code un facteur de transcription de 206 acides aminés possédant un domaine d'activation en amino-terminal et un domaine bZIP en carboxy-terminal. Contrairement à Tax, qui est rarement exprimée au stade ATL, HBZ apparaît exprimée de manière constitutive *in vivo* dans la majorité des clones, bien qu'à un faible niveau, et à tous les stades de l'infection. En dehors de la protéine HBZ, l'ARN HBZ semble également jouer un rôle dans l'infection. En effet, l'expression d'un vecteur porteur d'une mutation empêchant la traduction de la protéine HBZ ne réduit pas les effets sur la prolifération cellulaire suggérant ainsi un rôle direct de l'ARN indépendamment de la protéine HBZ. En fait, l'ARN d'HBZ semble augmenter le nombre de cellules par l'inhibition de l'apoptose alors que la protéine HBZ favoriserait la prolifération des lymphocytes mais également leur entrée en apoptose (Mitobe et al., 2015; Satou et al., 2006).

Il existe une dualité fonctionnelle entre Tax et HBZ. Au niveau transcriptionnel, HBZ est un régulateur négatif de la transcription virale. La formation de dimères HBZ/CREB-2 et HBZ/CBP/p300 empêche Tax d'interagir avec ces facteurs transcriptionnels, inhibant ainsi la transactivation de l'expression virale (Clerc et al., 2008; Lemasson et al., 2007). HBZ séquestre également d'autres facteurs transcriptionnels activés par Tax : AP-1 (Matsumoto et al., 2005), NF- $\kappa$ B (Zhao et al., 2009) et la  $\beta$  caténine (Matsuoka and Yasunaga, 2013). À l'inverse, HBZ transactive l'expression de TGF- $\beta$  inhibée par Tax (Zhao et al., 2011). Les travaux récents de l'équipe de Giam suggèrent que l'équilibre d'expression entre Tax et HBZ permet d'échapper à la sénescence cellulaire induite par l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B par Tax et favorise ainsi la persistance des clones infectées et leur transformation cellulaire.

HBZ et Tax favorisent cependant chacune l'instabilité génomique. HBZ inhibe le système de réparation de l'ADN des cassures double brin le NHEJ en retardant également l'activation de l'DNA-PK (DNA protein kinase). À terme, ceci participerait au maintien et à l'accumulation de défauts chromosomiques observés au cours de l'oncogenèse médiée par le virus HTLV-1 (Rushing et al., 2018a).

## E. L'infection par HTLV-1 dérègle l'expression des gènes cellulaires

### 1. Impact quantitatif sur le transcriptome cellulaire

#### a) *Les gènes cellulaires codant les protéines*

La comparaison de l'expression des gènes de des cellules de patients atteint d'ATL et de clones cellulaires CD4+ infectés non-transformés obtenus par culture en dilution limite des cellules mononuclées de patients révèlent que les transcrits dérégulés quantitativement sont engagés dans des voies fonctionnelles majeures tels que le « cancer », la voie de signalisation des MAPK, les adhésions focales et les interactions entre les cytokines et leurs récepteurs (Thénoz et al., 2014). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents du groupe de Pise-Masison où une comparaison par puce à ADN entre des PBMC issues de patients sains et des cellules immortalisées par HTLV-1 (Champ (ATL), Bes (ATL) et ACH.WT) révèle également des défauts d'expression des gènes, notamment une surexpression de gènes codants pour des cytokines et chemokines et leurs récepteurs respectifs (Pise-Masison et al., 2002). Il a été montré que les gènes codant pour l'interleukine IL-2 et de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à IL-2 (*IL2RA*) sont surexprimés sous l'effet de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par l'oncoprotéine Tax (Ruben et al., 1988). Il a été également proposé que la surexpression de nombreuses molécules d'adhésion dans les cellules au stade ATL favoriserait l'invasion tumorale. La surexpression de la L-sélectine reliée à l'expression de Tax favorise l'adhésion aux cellules endothéliales et l'infiltration hépatique des cellules infectées chez des patients atteints d'ATL (Tatewaki et al., 1995). L'expression de CADM-1 (Cell Adhesion Molecule 1), une immunoglobuline présente à la surface des cellules infectées, constitue à l'heure actuelle un marqueur majeur des cellules infectées par HTLV-1 (Sasaki et al., 2005). Une augmentation de l'expression de facteurs de transcription et des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a également été observée dans des modèles cellulaires distincts (Harhaj et al., 1999; de La Fuente et al., 2000).

L'étude des cellules issues de patients TSP/HAM révèle également l'activation de voies associées au cycle cellulaire et à la prolifération. Des dérégulations de gènes sous le contrôle de p53 et l'activation des gènes induits par IFN (interféron) semblent leur être spécifiques. Plus précisément, le profil d'expression de 80 gènes induits par INF constitue une signature spécifique des cellules de patients atteints de TSP/HAM. L'intensité de l'expression de ce sous-ensemble de gènes est corrélée à la sévérité clinique observée chez les patients. Selon les auteurs de cette étude, ces dérégulations semblent ne pas correspondre à une réponse de l'hôte contre le virus mais elles contribueraient plutôt au développement de la TSP/HAM (Tattermusch et al., 2012).

On retrouve des résultats similaires aux cellules d'ATL dans les lignées cellulaires C8166 et HUT102 qui sont chroniquement infectées par HTLV-1. Il est à noter que l'analyse par clusters hiérarchiques des profils d'expression révèle que les lignées cellulaires dérivées d'ATL sont plus proches entre elles suggérant ainsi des différences avec les lignées C8166 et HUT102 chroniquement infectées par HTLV-1 *in vitro*. Parmi les différences notables entre ces lignées cellulaires chroniquement infectées et les lignées cellulaires dérivées d'ATL, il a été observé que le TNF $\alpha$  est surexprimée dans les lignées cellulaires mais pas dans les cellules de patients (Champ et BES).

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les modifications transcriptionnelles sont encore mal compris. De nombreux travaux ont adressés le rôle des oncoprotéines Tax et HBZ via leurs interactions multiples avec les régulateurs de la transcription des gènes cellulaires. Dans ce manuscrit, nous traitons principalement des dérégulations quantitatives et qualitatives de l'expression des gènes par l'oncoprotéine Tax via l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B (**Chapitre III partie C**).

Plus récemment, il a été décrit que les modulations du transcriptome observées dans les cellules hôtes peuvent également être reliées à l'intégration du provirus (Melamed et al., 2018; Rosewick et al., 2017b). Les données de RNA-seq (**Annexe3**) générées à partir de clones de cellules transformée par HTLV-1 montrent une surexpression des gènes proches des sites d'insertion du provirus en amont et en aval de ces sites. Parmi les mécanismes de cis-activation

de l'expression des gènes, il a été démontré que la présence d'un site CTCF dans le génome viral favorise les contacts chromatinien entre le provirus et des gènes cellulaires distants de plusieurs mégabases. Ces rapprochements physiques sont corrélés à la modulation de l'expression des gènes présents dans ces régions chromatinien (Melamed et al., 2018). Ces données ont été obtenues par l'utilisation d'une technique d'étude de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine, le 4C (circular chromosome conformation capture) quantitatif et par l'utilisation de la technique de CRISPR/Cas9 (**Annexe 3**) permettant de muter de manière spécifique le site CTCF du provirus. Les dérégulations géniques liées aux contacts chromatinien entre le provirus et les gènes distaux sont reliés à la présence du site CTCF.

### *b) Les gènes codant pour les micro-ARN (miRNA)*

L'étude du transcriptome dans les cellules HTLV-1 et les cellules primaires d'ATL met en évidence une dérégulation de l'expression des micro-ARN (miRNAs). Les lignées cellulaires transformées par le virus HTLV-1 présentent une augmentation de l'expression des miR-21, miR-24, miR-146a et miR-155 alors que le miR-223 est réprimé (Watanabe, 2017). La recherche de dérégulations de micro-ARN dans les cellules T-CD4+ et CD8+, infectées ou non, issues de patients atteints de TSP/HAM a permis d'identifier une dérégulation des miR-17 et miR-21 dans les cellules CD4+ infectées et non dans leurs contreparties CD8+. Ces dérégulations sont dépendantes de l'oncoprotéine HBZ via un mécanisme post-transcriptionnel (Vernin et al., 2014) où HBZ favorise la maturation des pri-miR-17 et -21. L'expression des miR-17 et miR-21 inhibe l'expression des transcrits *OBFC2A* codant pour un facteur de réparation de l'ADN. L'ensemble de ces événements génère une l'instabilité génétique de la cellule qui peut contribuer au développement de l'ATL (Vernin et al., 2014). Les cellules primaires ATL quant à elles semblent réprimer de manière globale l'expression des miRNA notamment les miR-181a, miR-132, miR-125 et le miR-31 (Watanabe, 2017). Plus particulièrement, il a été démontré que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B permet la surexpression de l'histone méthyltransférase EZH2 (Fujikawa et al., 2015; Yamagishi et al., 2012). Cette surexpression inhibe l'expression du miR-31 ce qui initie l'expression constitutive de la kinase NIK. Ce mécanisme permettrait l'activation persistante de la voie NF- $\kappa$ B et la prolifération cellulaire (Fujikawa et al., 2015; Yamagishi et al., 2012).

## 2. Modifications qualitatives du transcriptome cellulaire

Outre les effets transcriptionnels, des altérations qualitatives des transcrits ont été mises en évidence au cours de l'infection *in vivo* (Kataoka et al., 2015; Rosewick et al., 2017a; Thénnoz et al., 2014; Vernin et al., 2014). Notre laboratoire a été le premier à étudier les profils d'expression des exons des clones cellulaires T CD4+ infectés ou non et transformés ou non-transformés *in vivo*. L'analyse par cluster hiérarchique de l'expression de 3977 exons (correspondant à 2218 gènes) permet de discriminer les échantillons en trois groupes : les clones non transformés non infectés, les clones non transformés infectés et le groupe des ATL (Thénnoz et al., 2014). Près de 50% des gènes régulés en épissage n'étaient pas modifiés au plan quantitatif dans leur expression, suggérant des mécanismes de modification d'épissage indépendants du niveau d'expression des gènes. Dans ce sens, les analyses de Gene Ontology (GO) indiquent que les gènes régulés en épissage sont engagés en réalité dans des voies fonctionnelles distinctes de celles affectées par les modifications transcriptionnelles. Ces données ouvrent de nouvelles voies d'investigations pour la compréhension des mécanismes de l'infection.

Plus récemment, des études ont observé des évènements d'épissage alternatif atypiques dans les cellules d'ATL. Des modifications du génome telles que des délétions et/ ou inversions chromosomiques engageant des sites de régulation de l'épissage (5' et 3') permettent d'expliquer certaines exclusions d'exons et rétentions d'introns (Kataoka et al., 2015). Par ailleurs, des transcrits dits chimériques comportant des séquences virales flanquées de séquences cellulaires ont été détectés dans les cellules d'ATL et seraient le reflet d'un défaut de terminaison de la transcription antisens de la séquence provirale qui empièterait sur les gènes flanquant le site d'intégration du virus (Kataoka et al., 2015; Rosewick et al., 2017a). Néanmoins, les mécanismes qui promeuvent ces événements atypiques, le rôle des régulateurs transcriptionnels Tax et HBZ, et les effets fonctionnels de ces transcrits atypiques et/ou chimériques sur l'infection et la pathogenèse liée à HTLV-1 restent encore inconnus.

### Cellules infectées par HTLV-1

- PBMC issues de Patients
- Clones cellulaires infecté ou non obtenus par dilution limite
- Lignées cellulaires infectés ou non dérivées de cellules de patients ATL (BES et Champ)
- Lignées HTLV-1 transformées *in vitro* (C8166 et Hut102)



Dérégulations transcriptionnelles  
**Quantitatives**

Dérégulations transcriptionnelles  
**Qualitatives**

Gènes cellulaires  
Voies fonctionnelles engagées:  
Interaction Cytokine-cytokine récepteur  
Voie MAPK  
Adhésion Cellulaire

miRNA  
miR-17  
miR-21  
miR-24  
miR-31  
miR-146a  
miR-155  
miR-223

Modifications du profil d'Épissage  
Voies fonctionnelles engagées:  
Endocytose  
Cytosquelette d'actine  
Cycle cellulaire

Figure 12 : Schéma récapitulatif des dérégulations de l'expression des gènes cellulaires associées à l'infection par le virus HTLV-1

## F. L'oncoprotéine Tax

Les effets oncogènes de Tax reposent sur ses capacités à affecter plusieurs systèmes cellulaires contrôlant la viabilité cellulaire et la stabilité du génome.

### 1. Effets pléiotropes de Tax sur les systèmes cellulaires

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

Tax régule l'apoptose principalement via l'inhibition fonctionnelle du suppresseur de tumeur p53, médiateur crucial de l'apoptose, et son inhibition est fréquemment observée dans les cancers. Tax est capable d'inhiber deux voies d'apoptose : la voie intrinsèque activée principalement par un stress cellulaire et la voie extrinsèque activée par la liaison de ligands extracellulaires au niveau des récepteurs de mort Fas, CD95 et DR4. La protéine Tax dérégule transcriptionnellement différents gènes de la voie pro- et anti-apoptotique : elle active l'expression de nombreuses molécules anti-apoptotiques telles que BCL-xL, c-FLIP, CXCR7, ou encore Bcl-3 (Macaire et al., 2012; Mori et al., 2001a; Saito et al., 2010; Tsukahara et al., 1999a; Wäldele et al., 2006) et elle réprime l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bax (Brauweiler et al., 1997; Mühleisen et al., 2014). Ces dérégulations sont dépendantes de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax (Mori et al., 2001a; Tsukahara et al., 1999b; Wang et al., 2014).

#### *b) Tax et le cycle cellulaire*

Le contrôle du cycle cellulaire est dépendant de trois grandes familles de protéines : les cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (CDK), ainsi que les inhibiteurs de CDK (CKI). L'une des étapes clés de régulation du cycle cellulaire est le passage de la phase G1 à la phase S, permettant l'entrée en prolifération des cellules. La protéine Tax cible spécifiquement cette étape et provoque une accélération de la phase G1 sans changement de la durée de la phase S. Tax induit la surexpression des cyclines D1 et D2 permettant ainsi l'association de la cycline D2 avec la kinase CDK6, CDK4 ou CDK2 dans des cellules de patients infectés par HTLV-1 (Iwanaga et al., 2008). Le complexe Tax-CDK/cycline D potentialise également la

phosphorylation et le changement de conformation de la protéine pRb et qui permet la libération du facteur E2F1 (Haller et al., 2002; Kehn et al., 2005). Tax interagit avec p15<sup>INK4b</sup> et p16<sup>INK4a</sup> et empêche leur activité répressive sur CDK4 (Nicot, 2015). L'activation des CDK est amplifiée par la capacité de Tax à réprimer l'expression des CKI p19<sup>INK4D</sup> et p27<sup>Kip1</sup> (Iwanaga et al., 2001). De plus, Tax est aussi impliquée dans le déclenchement précoce de l'anaphase en interférant avec le complexe APC/Cdc20 (Liu et al., 2005) (Figure 13).

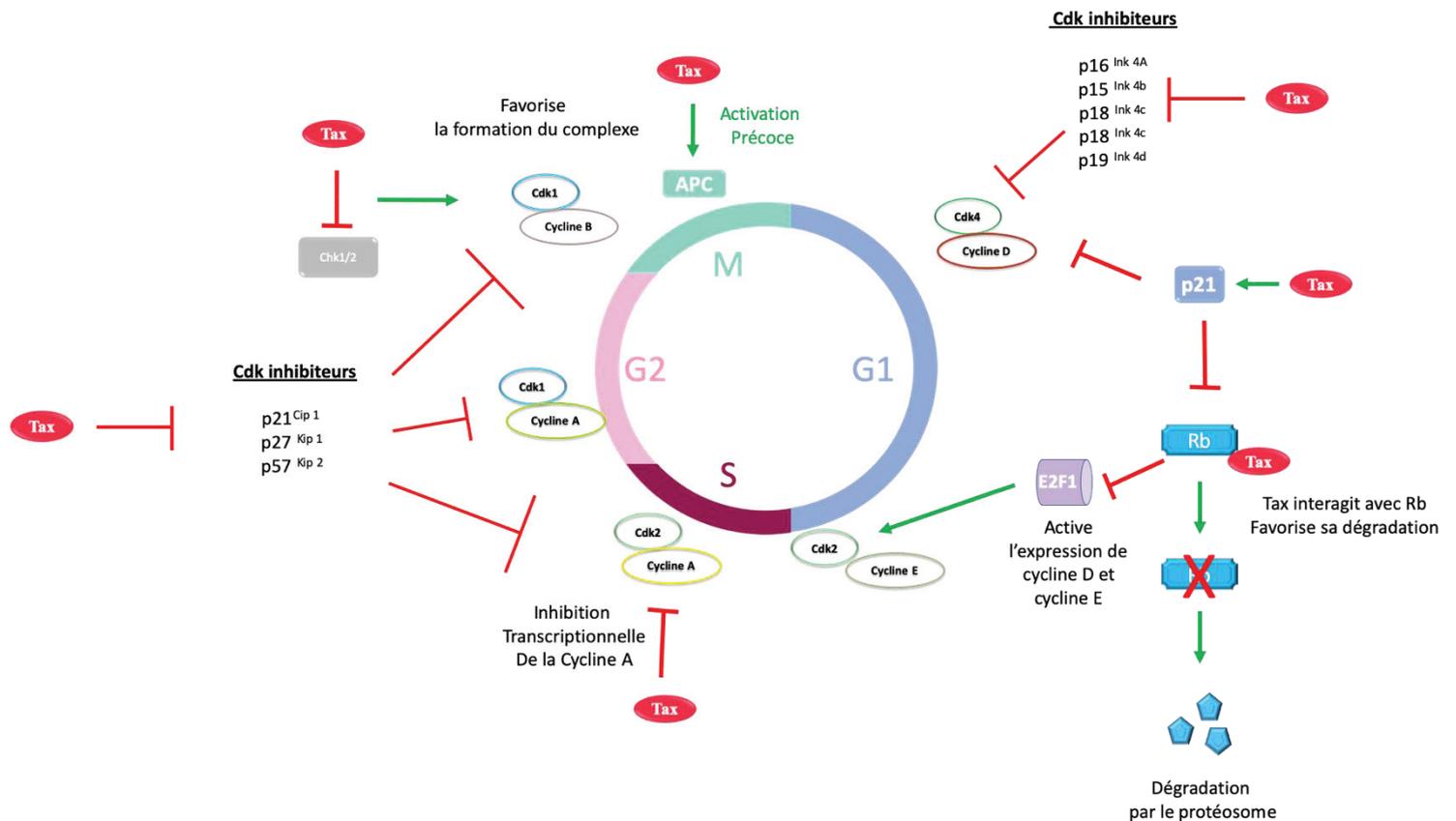


Figure 13 : L'oncoprotéine Tax dérégule des acteurs majeurs du cycle cellulaire

### *c) Tax favorise l'aneuploidie*

L'activation prématurée du complexe APC (Anaphase Promoting Complex) induite par Tax est associée à des défauts de ségrégation chromosomique qui résultent d'une mauvaise mise en place du fuseau mitotique (Kuo and Giam, 2006; Liu et al., 2005). Les cellules de patients atteints d'ATL présentent des centrosomes surnuméraires (Peloponese et al., 2005). Il a été montré que Tax interagit avec TAX1BP2, une protéine impliquée dans l'homéostasie du centrosome. La perte de l'interaction entre ces deux protéines abroge l'effet de Tax sur la formation de centrosomes surnuméraires et de même, l'inhibition de TAX1BP2 induit la présence de centrosomes surnuméraires (Ching et al., 2006). En mitose, Tax interfère avec le processus de ségrégation des chromosomes en interagissant physiquement avec la protéine hsMAD1 (Mitotic Arrest Defective). Cette interaction aboutit à un défaut de fixation des centromères au fuseau mitotique et favoriserait l'aneuploïdie (Jin et al., 1998).

### *d) Tax inhibe les systèmes de réparation de l'ADN*

Les cellules infectées par le virus HTLV-1 présentent des mutations, des insertions ou des délétions de gènes, ainsi que des anomalies chromosomiques (structure et nombre). Il a été montré que Tax participe à l'apparition de ces anomalies. En effet, cette oncoprotéine inhibe les machineries de détection et de réparation des dommages à l'ADN. Elle inhibe le mécanisme NER par l'activation transcriptionnelle du facteur PCNA, permettant ainsi d'augmenter la processivité de la polymérase (Lemoine et al., 2000). Tax inhibe également l'expression de la polymérase  $\beta$  du système de réparation BER (Jeang et al., 1990). Enfin, Tax empêche le bon fonctionnement du système de réparation NHEJ via l'inhibition transcriptionnelle du facteur Ku80. Paradoxalement, l'expression de Tax contribue à l'augmentation de l'activité de la DNA-PK. Tax favorise la réparation via le NHEJ au détriment de la recombinaison homologue (HR) (Baydoun et al., 2012; Ducu et al., 2011; Durkin et al., 2008)(Rushing et al., 2018a). De plus, Tax ralentit l'avancée de la fourche de réplication ce qui participe à l'apparition de cassures double brin en phase S du cycle (Chaib-Mezrag et al., 2014).

HBZ est également impliquée dans l'instabilité génomique des cellules issues de patients infectés par HTLV-1 en diminuant l'expression du facteur de réparation OBFC2A via ses effets

potentialisateurs sur l'expression des miR-17 et miR-21 (Vernin et al., 2014) et en interagissant directement avec les deux sous-unités de la voie de réparation du NHEJ, Ku70 et Ku80 via son domaine b-Zip (Rushing et al., 2018b).

## 2. Tax : un transactivateur transcriptionnel des gènes cellulaires

### a) Tax interagit avec des facteurs de transcription

La protéine Tax a une faible affinité pour l'ADN et ne se lie pas directement aux séquences régulatrices mais interagit avec des facteurs de fixation à l'ADN impliqués dans la régulation transcriptionnelle.

Parmi eux, CREB/ATF et ses protéines co-activatrices ont été impliqués dans la régulation de l'expression du virus en se fixant directement à la séquence TxRE (Tax response element) du LTR5'. Tax interagit avec les facteurs CREB/ATF et renforce leur fixation au TxRE (Lundblad et al., 1998). Tax est aussi capable via CREB de réguler l'expression des gènes cellulaires tels que *c-Fos*, mais elle peut également réprimer d'autres gènes cibles comme la *cycline A* et *B-mycb* (Kibler and Jeang, 2001; Nicot et al., 2000).

Tax module également l'expression des gènes sous le contrôle de motifs SRE (Serum Response Element). Tax interagit avec SRF (Serum Response Factor) et avec différents membres du complexe TCF (Ternary complex factor) dont Elk1 et Est1 (Dittmer et al., 1997; Shuh and Derse, 2000).

D'autres facteurs nucléaires sont ciblés par Tax, on peut citer les protéines de liaison CCAAT telles que NF-YB et C/EBP $\beta$  qui lui permettent d'activer l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Boxus et al., 2008; Hivin et al., 2004; Tsukada et al., 1997).

Tax interagit avec le complexe d'initiation de la transcription dont TFIIA et TFIID (TBP et TAFII28). Par cette interaction, Tax renforce la liaison de la sous-unité TBP à la séquence TATAA

et potentialise l'initiation de la transcription à partir du LTR. La mise en place du complexe de pré-initiation permet le recrutement de l'ARN polymérase II (ARNPII). L'initiation de la transcription nécessite la phosphorylation de l'ARNPII sur les sérines 5 et 2 au sein du domaine CTD. Cette phosphorylation est dépendante des kinases CDK9 et TFIIH. Dans ce système, Tax recrute pTEFb en interagissant avec la cycline T1 et la kinase CDK9. Le recrutement de pTEFb au niveau du LTR 5' favorise la phosphorylation en Serine 2 du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARNPII et l'élongation de la transcription (Cho et al., 2007; Zhou et al., 2006).

## *b) Les protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire*

### (1) La voie MAPK

La voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est hyperactivée dans de nombreux cancers. Tax interagit avec MAP3K (MAP kinase kinase kinase), MEKK1 (MAPK / ERK kinase kinase 1) et TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) (Wu and Sun, 2007; Yin et al., 1998). Tax se lie notamment à l'extrémité N-terminale de MEKK1 et stimule son activité kinase. Cela permet l'augmentation de l'activité IKK conduisant à la phosphorylation et la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ . Tax interagit également avec la sous-unité  $\beta$  des protéines G et avec plusieurs membres de la petite famille des Rho GTPases tels que RhoA (Wu et al., 2004). Suite à l'activation de la voie MAPK, la protéine G RhoA est activée et permet l'hydrolyse du GTP en GDP. RhoA est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont l'organisation du cytosquelette. Tax se lie à RhoA et pourrait ainsi favoriser l'établissement de la synapse virologique (Nejmeddine et al., 2005).

## (2) La voie PI3K/AP-1 et la voie TGFβ

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est une des voies de signalisation qui s'ouvre en aval de l'interaction d'un facteur de croissance avec un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Elle suit donc un chemin parallèle à la voie des MAP kinases. Tax active cette voie en perturbant le complexe p85a/p110α conduisant à une phosphorylation d'AKT en Ser473 et une activation d'AP1 (Peloponese and Jeang, 2006; Ueki et al., 2002).

À l'inverse, Tax réprime la signalisation SMAD permettant ainsi aux cellules HTLV-1 positives d'être résistantes au TGFβ. Cette inhibition est médiée par l'interaction de Tax avec les extrémités C terminales de Smad2, Smad3 et Smad4 empêchant ainsi leur fixation à l'ADN (Arnulf et al., 2002; Lee et al., 2002; Mori et al., 2001b).

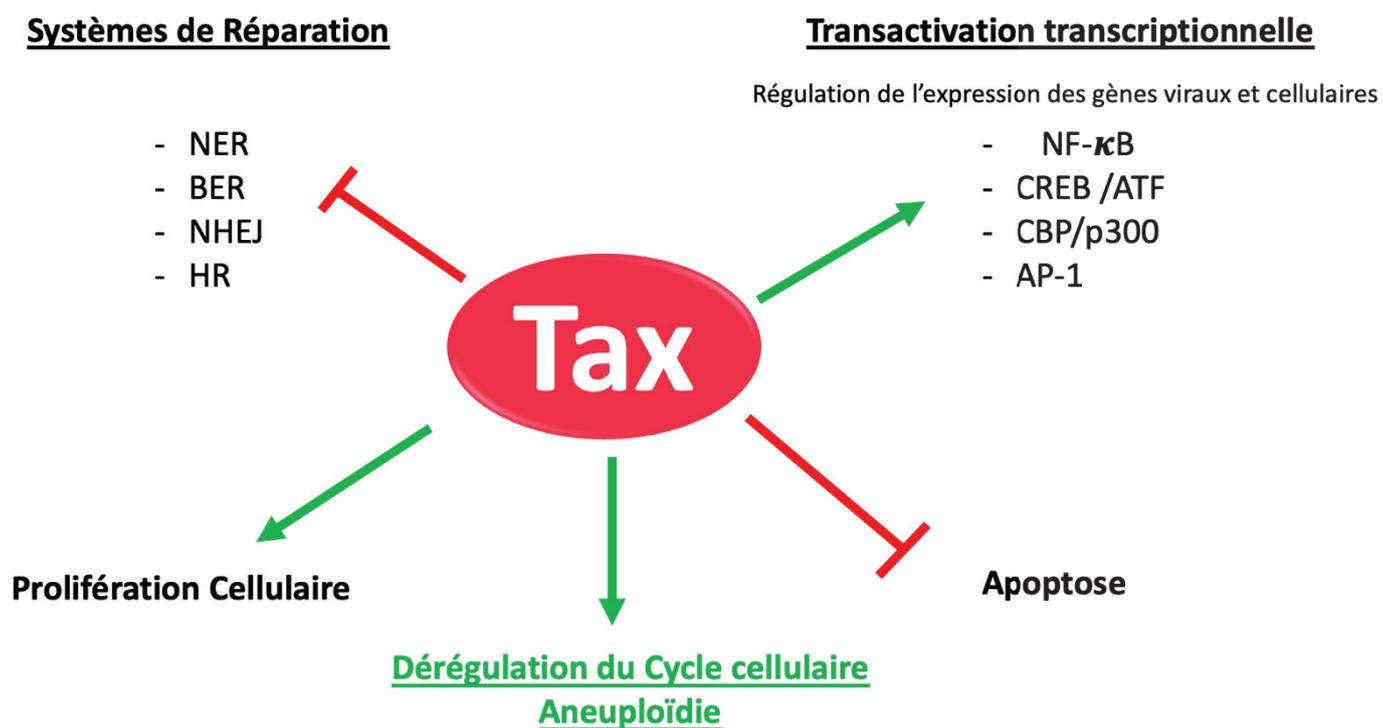


Figure 14 : Schéma simplifié des effets pléiotropiques de Tax

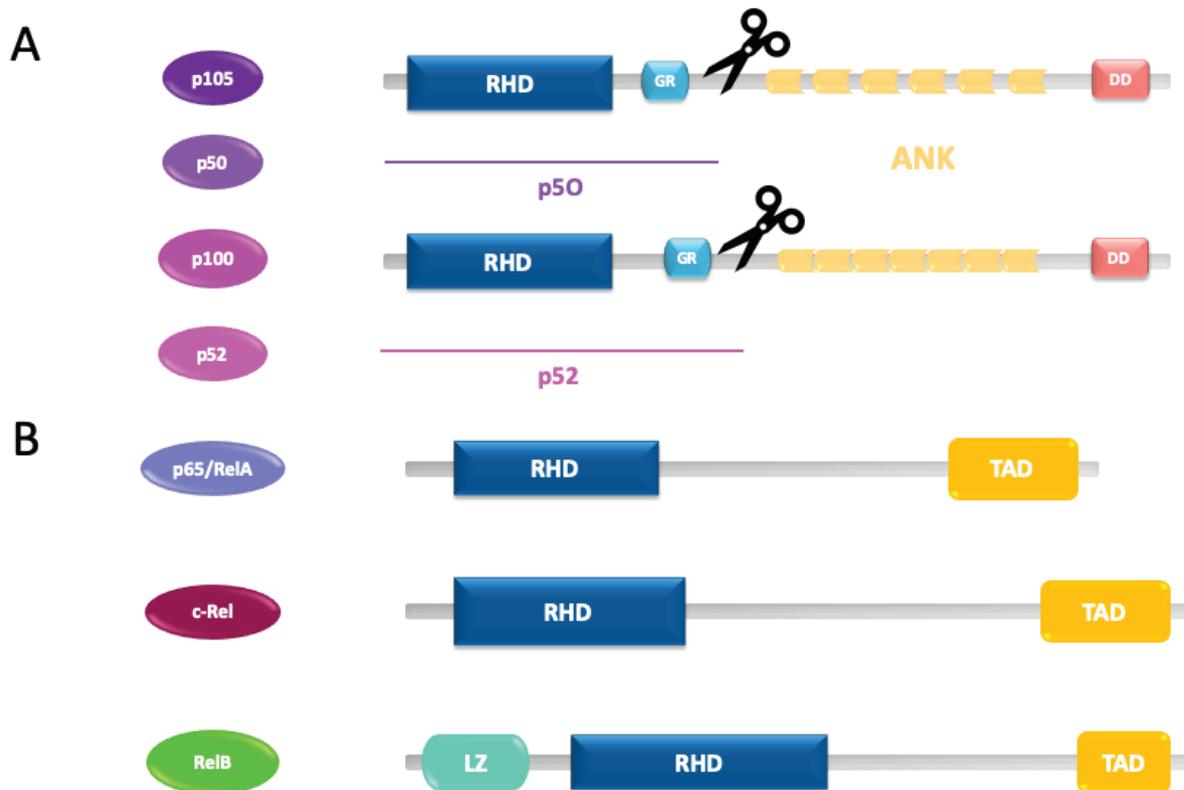
### III. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B : un acteur majeur de la physiopathogénie de l'infection

#### A. Activation physiologique de la voie NF- $\kappa$ B

##### 1. Généralités

Les facteurs NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ appa B) ont été décrits pour la première fois par Sen et Baltimore comme étant rapidement induits dans les lymphocytes B et régulant l'expression de la chaîne  $\kappa$ appa des immunoglobines (Sen and Baltimore, 1986). Ce facteur est également impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la survie, l'apoptose ou encore participe à la réponse immunitaire (Hayden and Ghosh, 2004). Les facteurs NF- $\kappa$ B comportent cinq membres : RelA/p65, RelB, cRel, p50 et p52 (Hayden and Ghosh, 2004; Pires et al., 2018). Ces sous-unités sont caractérisées par un domaine unique de fixation à l'ADN présent au sein du domaine RHD. On peut les classer en deux groupes :

- Les sous-unités p50 et p52 formées respectivement à partir des précurseurs NF $\kappa$ B1/p105 et NF $\kappa$ B2/p100, qui ne possèdent pas le domaine de transactivation (TAD), région essentielle pour l'activation de la transcription des gènes cibles.
- Les sous-unités RelA/p65, RelB et cRel, contrairement aux facteurs du premier groupe sont dotées du domaine TAD (**Figure 15**).



**Figure 15 : Structure schématique des sous-unités NF- $\kappa$ B**

A. Les précurseurs p105 et p100 forment respectivement les sous-unités p50 et p52 *via* le clivage protéolytique du protéasome. B. Les protéines p65/RelA, c-Rel et RelB sont composées du domaine RHD (Region Homology Domain) et du domaine de transactivation TAD. La protéine RelB présente également un domaine Leucine Zipper.

## 2. Au niveau cytoplasmique

En l'absence de stimuli, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme par les protéines I $\kappa$ B. La famille I $\kappa$ B est composée de 8 membres : I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  (NF $\kappa$ B 1/p105), I $\kappa$ B $\delta$  (NF $\kappa$ B 2/p100), Bcl3 (B-cell lymphoma 3), I $\kappa$ B $\zeta$  et I $\kappa$ BNS (Ghosh et al., 2012). Les protéines I $\kappa$ B masquent la séquence NLS (Nuclear Localization Signal) des dimères NF- $\kappa$ B empêchant ainsi leur translocation dans le noyau. De nombreux signaux sont capables d'activer la voie NF- $\kappa$ B comme les cytokines pro-inflammatoires, les agents infectieux et le stress oxydatif. Ce stimulus permet l'activation du complexe IKK (IKK1 (IKK $\alpha$ ), IKK2 (IKK $\beta$ ), IKK3 (IKK $\epsilon$ ), TBK1) qui induit la phosphorylation de la séquence consensus DSGXXS de la région N-Terminale des facteurs I $\kappa$ B (Ghosh et al., 2012; Häcker and Karin, 2006). Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitylation au niveau de la lysine 48 (K48) par la SCF ( $\beta$ TrCP) favorisant ainsi l'adressage et la dégradation des facteurs ubiquitylés par le protéasome (Krappmann and Scheidereit, 2005). Le motif d'import nucléaire des facteurs NF- $\kappa$ B est alors exposé permettant leur migration dans le noyau.

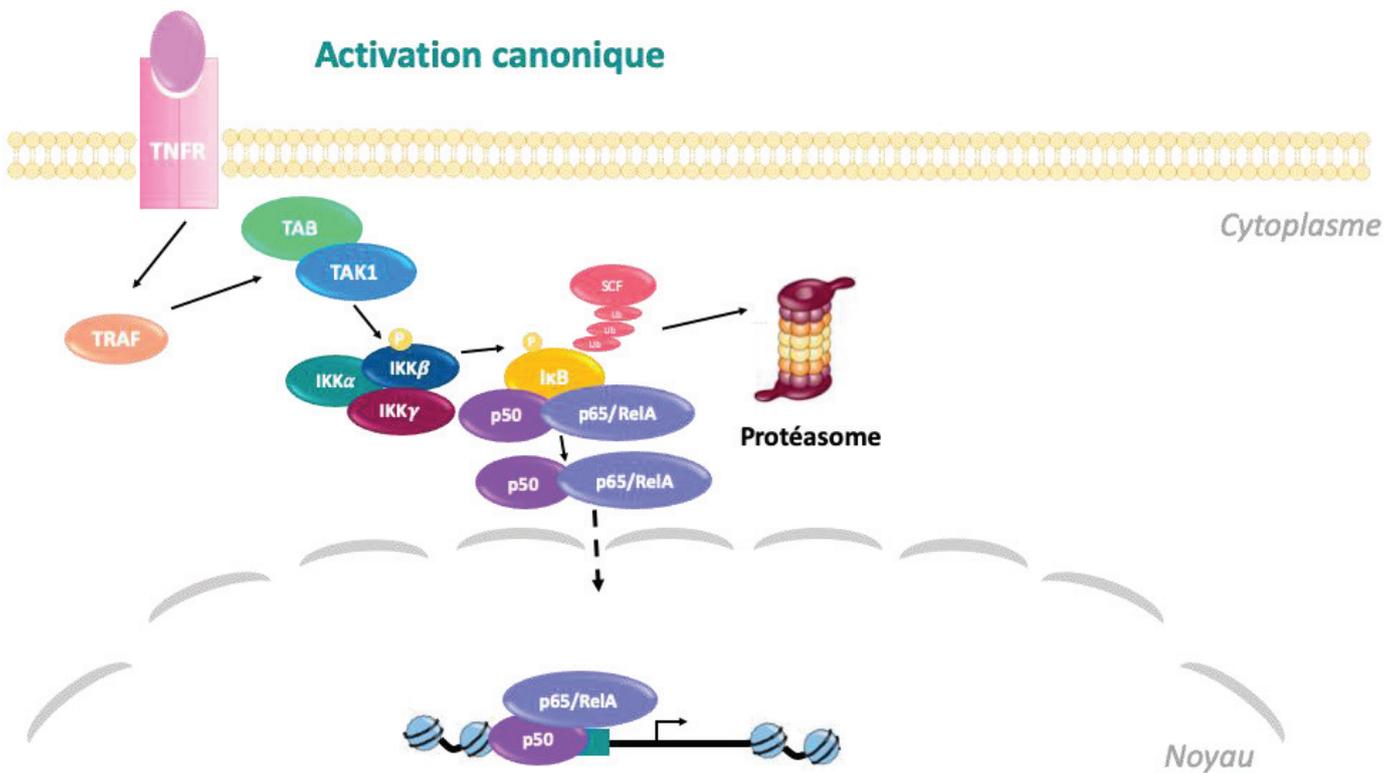
On distingue deux voies d'activation du complexe NF- $\kappa$ B : la voie canonique et la voie non canonique.

### *a) La voie canonique*

La voie canonique est activée lors de réponses inflammatoires ou immunitaires rapides, réversibles et brèves. Différents stimuli comme le LPS, des cytokines, des facteurs de croissance tels que TNF $\alpha$ , IL1, TLR, PAMPs et les DAMPS activent cette voie. L'activation par le TNF $\alpha$  permet le recrutement des protéines adaptatrices TRADD, RIP, TRAF2 et TRAF5. Ces protéines adaptatrices activent la kinase TAK1 (associée au récepteur du TNF $\alpha$ ), ce qui entraîne la phosphorylation du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase). Ce complexe est composé de trois sous-unités :

- IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  formant les sous-unités catalytiques (serine kinase)
- La sous-unité régulatrice IKK $\gamma$  aussi appelée NEMO (NF $\kappa$ B Essential Modulator).

La voie canonique entraîne l'activation du complexe NF- $\kappa$ B sous sa forme majoritaire RelA/p65-p50, ou du complexe cRel-p50 (**Figure 16**).



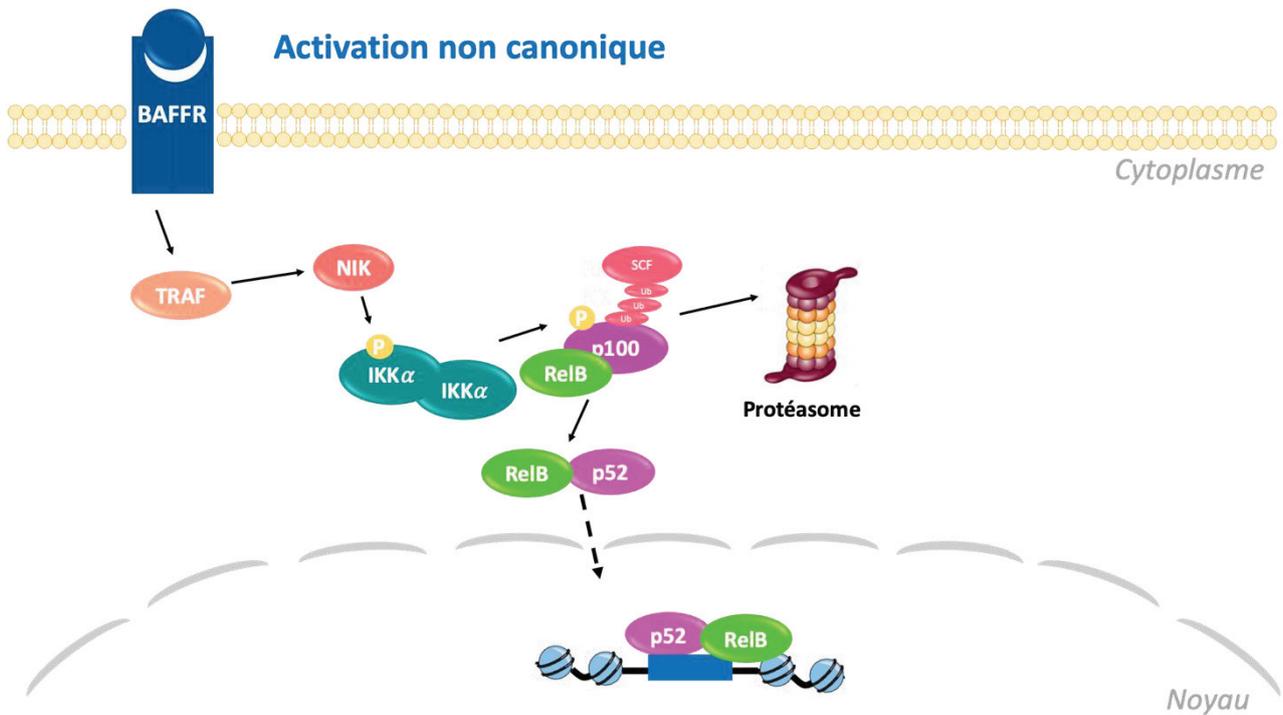
**Figure 16 : Schéma d'activation de la voie canonique**

Exemple de l'activation de la voie canonique par la fixation du TNF $\alpha$  sur son récepteur induisant l'activation du complexe IKK composé de NEMO, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ . Le complexe IKK phosphoryle à son tour I $\kappa$ B $\alpha$  provoquant son ubiquitinylation puis sa dégradation protéosomale libérant ainsi le complexe NF $\kappa$ B (RelA/p65-p50) qui migre au noyau.

### *b) La voie non canonique*

La voie non canonique est quant à elle dépendante de l'activation d'IKK $\alpha$  et de la kinase NIK. La voie non canonique active NF- $\kappa$ B sous la forme du complexe majoritaire RelB-p52 ou du complexe RelB-p50. Elle est stimulée par des signaux distincts dont le facteur d'activation des cellules B (BAFF), le ligand CD40, le LT $\beta$ R et RANKL. Les stimuli empêchent la dégradation par ubiquitinylation de la protéine kinase NIK par le complexe TRAF-ciAP. En effet, la kinase NIK induit la libération des complexes p50-RelB ou p52-RelB en phosphorylant directement p100 ou bien par la phosphorylation du complexe IKK $\alpha$  qui va par la suite phosphoryler le précurseur p100. La forme phosphorylée de p100 induit son ubiquitinylation au niveau de la lysine en

position 855 (Amir et al., 2004). Cette ubiquitinylation aboutit à son adressage au protéasome où elle est clivée pour former la sous-unité p52. (Figure 17).



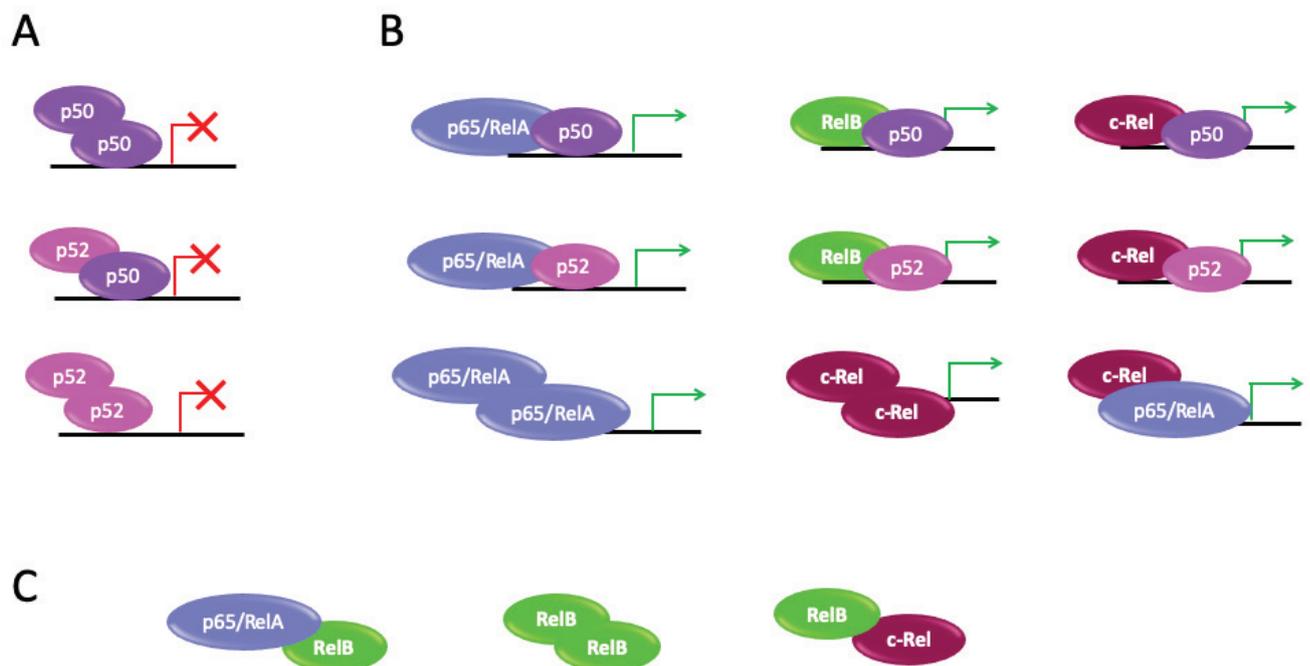
**Figure 17 : Schéma d'activation de la voie non canonique**

L'activation de la voie non canonique par BAFF permet d'activer la protéine NIK qui va à son tour phosphoryler et activer le complexe IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . p100 est alors maturé en p52. Le complexe RelB-p52 migre dans le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles.

### 3. Au niveau nucléaire

#### *a) Régulation transcriptionnelle dépendante du complexe NF- $\kappa$ B*

Les facteurs NF- $\kappa$ B sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de gènes associés à divers processus cellulaires tels que les réponses immunitaires innée et adaptative, l'inflammation et l'apoptose. Les facteurs NF- $\kappa$ B fonctionnent sous forme de dimères. Il existe 15 possibilités différentes de former un dimère NF- $\kappa$ B. Seuls 12 dimères peuvent se fixer à l'ADN et neuf d'entre eux sont capables d'induire la transcription des gènes cibles. Les dimères comportant les protéines RelA/p65, cRel et RelB peuvent induire la transactivation des gènes cibles. Les homodimères p50/ p50 et p52/ p52, dépourvus de domaine TAD, sont capables de se fixer sur l'ADN mais sont généralement associés à une répression transcriptionnelle (Schmitz and Baeuerle, 1991) (**Figure 18**). La libération des dimères NF- $\kappa$ B et leur translocation dans le noyau permettent à ces facteurs de pouvoir se fixer sur leur séquence cible via leur domaine RHD. Le motif consensus reconnu comme site  $\kappa$ B est 5'-GGGRNYYYCC-3' (R : purine, Y : pyrimidine and N : nucléotide au choix) (Sen and Baltimore, 1986). Les sites  $\kappa$ B peuvent être présents au niveau des promoteurs, enhancers et au niveau des corps des gènes cibles (introns et exons) de la voie NF- $\kappa$ B. Au niveau des promoteurs, l'activation transcriptionnelle par les facteurs NF- $\kappa$ B engage le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine tels que CBP/p300.



**Figure 18 : Différentes combinaisons possibles formant le complexe NFκB et impact sur la transcription des gènes cibles**

**A.** Les dimères dépourvus de domaine TAD capables de se fixer sur ces séquences cibles et associés à une répression de la transcription de ces gènes cibles. **B.** Les dimères dits « actifs ». **C.** Les dimères incapables de se fixer à l'ADN

Le mécanisme décrit ci-dessus résulte de l'étude de l'activation des gènes cibles les plus connus (NFKBIA, TNFAIP3, ...). Cependant, les mécanismes qui gouvernent une réponse transcriptionnelle rapide associée à l'activation des complexes NF-κB sont encore aujourd'hui peu décrits. Dans ce contexte, l'exploration de la distribution chromatiniennne des complexes NF-κB, en particulier celle de la sous-unité RelA/p65, ainsi que l'étude de la cinétique d'activation de ce facteur ont permis récemment d'améliorer nos connaissances sur ce mécanisme.

## (1) La distribution chromatinienne

La distribution chromatinienne des facteurs NF- $\kappa$ B a fait l'objet de nombreuses études menées dans différents types cellulaires (HeLa, GM12878, THP-1) ; (Borghini et al., 2018; Lim et al., 2007a; Martone et al., 2003; Zhao et al., 2014). Ces données révèlent que les facteurs NF- $\kappa$ B à la chromatine ne sont pas retrouvés majoritairement au niveau des régions promotrices. Notamment, Borghini *et al.*, montrent dans les cellules Detroit 562 que la grande majorité des pics RelA/p65 concerne les régions intergéniques (49%) et intragéniques (44%), alors que les régions promotrices ne constituent que 7% d'occupation de RelA/p65 (Borghini et al., 2018) (**Figure 19**). Par ailleurs, plus de 50% des sites de fixation détectés par ChIP-seq se situent en dehors des motifs consensus  $\kappa$ B suggérant que le complexe NF- $\kappa$ B peut se lier à d'autres séquences encore non identifiées, directement ou indirectement via l'interaction avec d'autres protéines associées à l'ADN (Kolovos et al., 2016). Par ailleurs, la présence des dimères NF- $\kappa$ B à la chromatine n'est pas toujours synonyme de régulation transcriptionnelle (Martone et al., 2003; Sacconi et al., 2003).

## Distribution chromatinienne

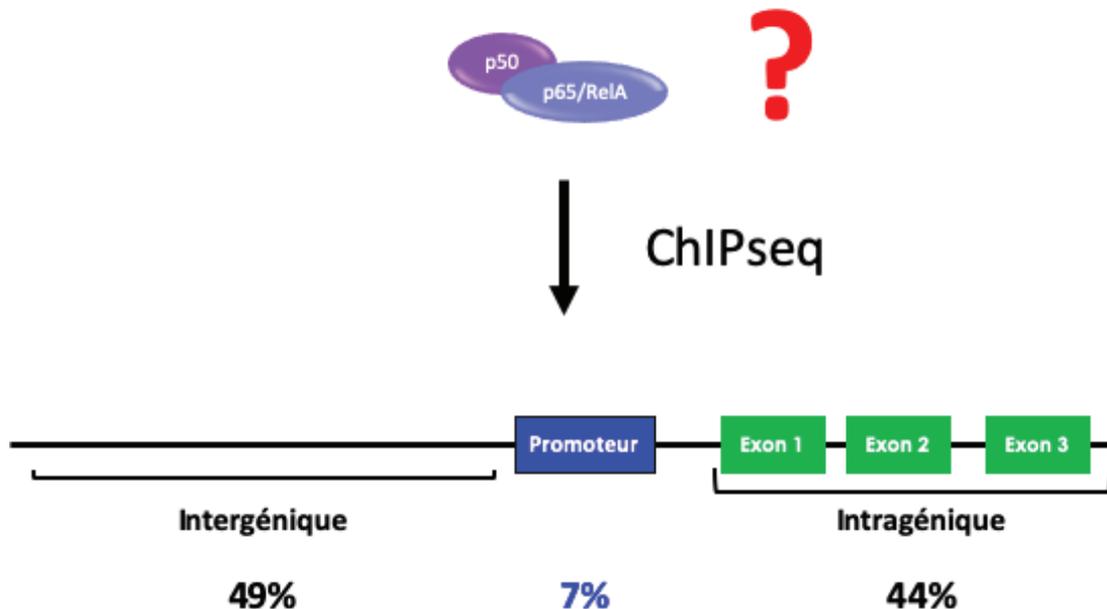


Figure 19 : Distribution chromatinienne de RelA/p65

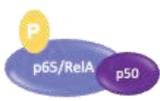
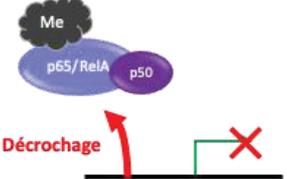
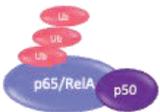
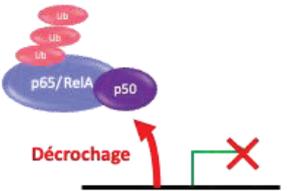
### (2) [Les sites \$\kappa\$ B et cofacteurs](#)

Les dimères NF- $\kappa$ B n'opèrent pas seuls, mais très souvent en coopération avec d'autres facteurs de transcription tels que Sp1 (Boekhoudt et al., 2003), AP-1 (Brown et al., 2014; Kolovos et al., 2016), les facteurs régulateurs d'interférons (IRF) (Freaney et al., 2013) et E2F1 (Lim et al., 2007a) pour contrôler la transcription des gènes. Un exemple très connu est l'expression du gène *IFN-B* : son activation nécessite le recrutement synergique du facteur NF- $\kappa$ B au niveau du motif conservé PRDII favorisant ainsi le recrutement successif du facteur IRF et du facteur ATF2/c-Jun. La conformation des dimères NF- $\kappa$ B s'adapte à la séquence du site  $\kappa$ B présent aux niveaux des gènes cibles, ces données suggèrent que la composition des sites  $\kappa$ B pourrait influencer le recrutement et l'interaction de cofacteurs (Chen et al., 1998). Notamment, la composition des sites  $\kappa$ B module le recrutement des cofacteurs, les gènes *cxcl10* et *MCP-1* répondent tous deux à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  mais

*via* des cofacteurs différents. Or, seul un nucléotide diffère entre les deux sites  $\kappa$ B suggérant que la composition nucléotidique du site  $\kappa$ B influence le recrutement de cofacteurs et le mode d'activation du gène cible (Leung et al., 2004).

### (3) Les modifications post-traductionnelles de RelA/p65 et leurs impacts sur l'activité transcriptionnelle

Le recrutement de cofacteurs est régulé par les modifications post-traductionnelles des sous-unités NF- $\kappa$ B. Pour RelA, il a été décrit que sa phosphorylation en serine 276 induit un changement conformationnel favorisant son interaction avec le complexe CBP/p300 au détriment de son interaction avec HDAC (histone désacétylase). Le complexe CBP/p300 à son tour acétyle la sous-unité RelA/p65 en lysine 310 (Zhong et al., 2002) et favorise la formation du complexe RelA/p65-pTEFb engagé dans l'initiation de l'élongation transcriptionnelle. Le tableau ci-dessous résume les modifications post-traductionnelles étudiées pour la sous-unité RelA /p65 et leurs impacts sur son activité transcriptionnelle.

Modifications post-traductionnelles de p65/RelA	Les sites ciblés	Les enzymes modificatrices	Impact sur l'activité transcriptionnelle
<b>Phosphorylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites de phosphorylation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ser 276</li> <li>- Ser 311</li> <li>- Ser 468</li> <li>- Ser 529</li> <li>- Ser 536</li> <li>- Thr 435</li> </ul>	<b>Les kinases</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PKA, MSK 1/2</li> <li>- PKCζ</li> <li>- GSK3β, IKKε, IKKβ</li> <li>- CK2</li> <li>- IKKα, IKKβ, RSK1</li> <li>- À définir</li> </ul>	<b>Renforce la fixation à l'ADN</b> 
<b>Acétylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites d'acétylation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- K 122</li> <li>- K123</li> <li>- K218</li> <li>- K 221</li> <li>- K 310</li> <li>- K 314</li> <li>- K 315</li> </ul>	<b>Les acétyltransférases</b> 	<b>K 221 et K 310</b>  <b>K 122 et K 123</b> 
<b>Méthylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites méthylation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- K218</li> <li>- K 221</li> <li>- K 314</li> <li>- K 315</li> </ul>	<b>Les méthyltransférases</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Set9</li> <li>- SOCS1</li> </ul>	
<b>Ubiquitinylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites d'ubiquitinylation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- K 314</li> <li>- K 315</li> </ul>	<b>Les ubiquitine ligase</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SOCS1</li> </ul>	

**Table 1 : Modifications post-traductionnelles de RelA et leurs impacts sur la transcription**

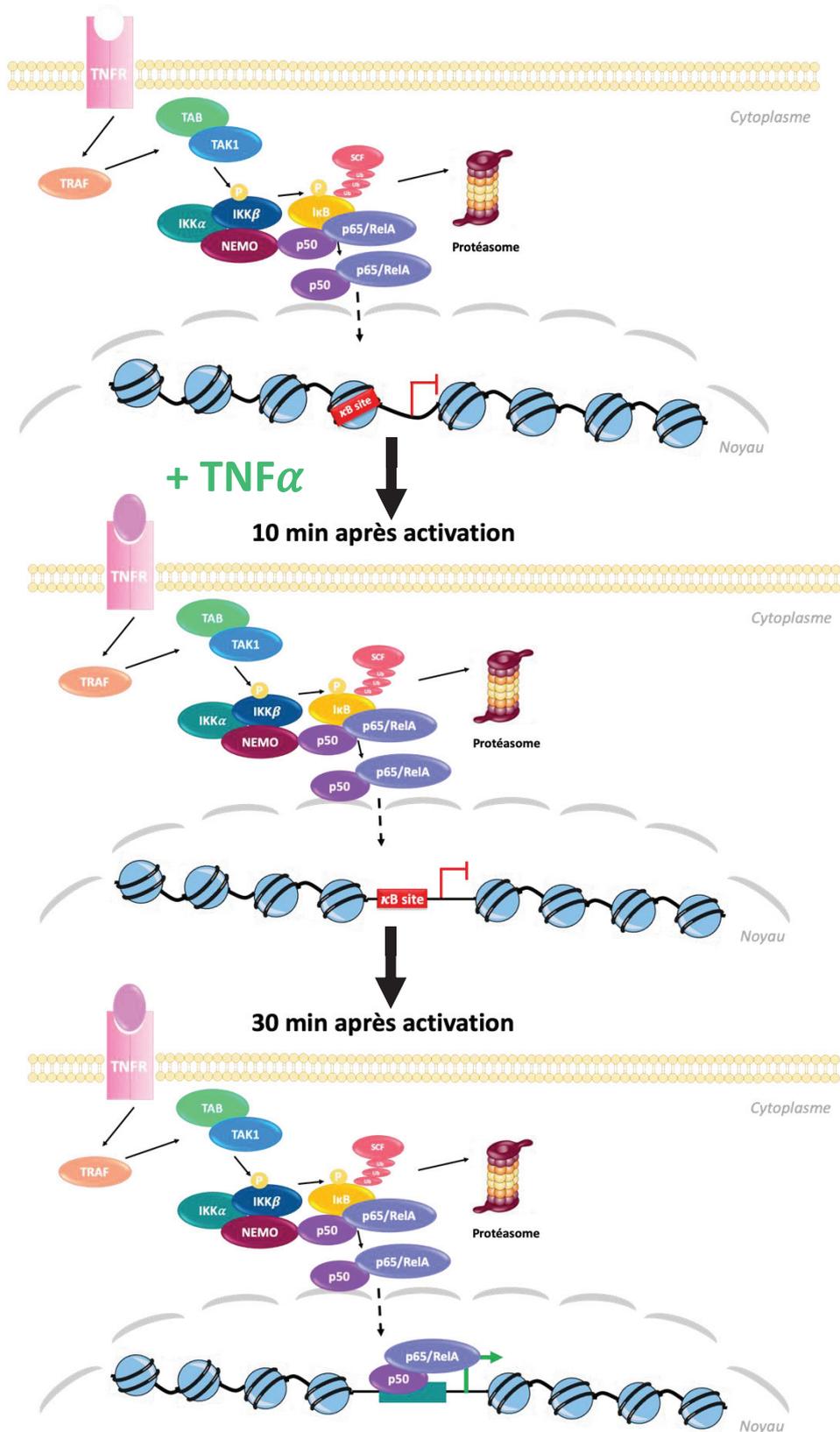
Les modifications post-traductionnelles induisant une répression de l'activité transcriptionnelle seront discutées dans la partie Modifications post-traductionnelle et arrêt de la transcription.

## *b) Cinétique d'activation transcriptionnelle dépendante des complexes NF- $\kappa$ B*

La cinétique d'activation de la voie NF- $\kappa$ B est importante pour comprendre la régulation de la transcription des gènes cibles. La liaison des dimères NF- $\kappa$ B à l'ADN est un processus dynamique qui permet de moduler rapidement l'expression des gènes cibles (Bosisio et al., 2006; Sacconi et al., 2003; Schreiber et al., 2006). Il a été décrit que le pré-recrutement des homodimères p50 et p52 au niveau de certains gènes cibles en l'absence de stimuli permet de maintenir une chromatine accessible, donc de fixer rapidement des dimères NF- $\kappa$ B actifs (possédant au moins un domaine TAD) lors de l'activation de la voie pour augmenter le recrutement de l'ARN polymérase II (Schreiber et al., 2006). Le complexe NF- $\kappa$ B est également en mesure d'influencer son environnement chromatinien par le biais de divers mécanismes, dont le recrutement des cofacteurs HDAC et CBP/p300 impliqués dans le remodelage de la chromatine par acétylation (Zhong et al., 2002).

### (1) Rôle du remodelage de la chromatine

De façon intéressante, les données de la littérature permettent de distinguer deux groupes de gènes régulés par les facteurs NF- $\kappa$ B. Le premier groupe est composé de gènes déjà exprimés en l'absence de stimuli qui sont par conséquent associés à une chromatine ouverte et facilement accessible au complexe NF- $\kappa$ B tandis que ceux de l'autre groupe nécessitent un remodelage préalable de la chromatine avant leur activation (Sacconi et al., 2001). Des travaux récents indiquent que ce mécanisme repose sur l'exposition des motifs de fixation aux facteurs NF- $\kappa$ B et/ou de leurs cofacteurs via le repositionnement des nucléosomes. Ce phénomène est indépendant de l'activité des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II car il s'effectue avant même l'entrée des dimères NF- $\kappa$ B dans le noyau et leur premier effet sur la transcription des gènes régulés (Diermeier et al., 2014) (**Figure 20**).



**Figure 20 : Remodelage de la chromatine en réponse à l'activation de la voie NF $\kappa$ B**

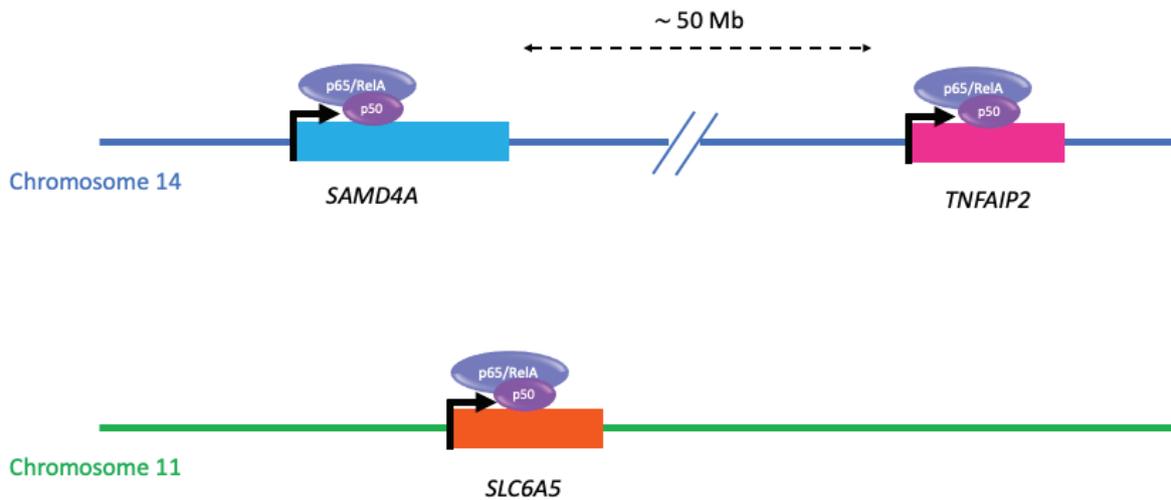
L'étude par MNase-seq (**Annexe 3**) de la distribution des nucléosomes à 0, 10 et 30 min après activation de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  révèle l'existence d'un repositionnement des nucléosomes pour permettre l'accès aux sites  $\kappa$ B avant l'entrée des complexes NF- $\kappa$ B dans le noyau.

## (2) Impact de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine

La transcription des gènes cellulaires est finement régulée dans le temps et l'espace. La coordination spatiale de l'expression des gènes fait intervenir une conformation tridimensionnelle de la chromatine qui met en contact des régions du génome parfois distantes de plusieurs mégabases. Ces boucles chromatinienne ont été identifiées comme des structures importantes pour la régulation de l'expression génique (Greenwald et al., 2019; Li et al., 2012; Papantonis et al., 2010; Schoenfelder et al., 2010) . Elles peuvent faire intervenir des séquences promotrices, et/ou insultrices (CTCF). La distribution des sites  $\kappa$ B n'apparaît pas uniquement concerner les régions promotrices des gènes, mais aussi celles définies comme enhancers qui, par contact avec les promoteurs, permettent la régulation de l'activité transcriptionnelle. Il a été montré dans les cellules IMR90 que les gènes cibles de RelA/p65 sont déjà engagés dans des boucles promoteurs/enhancers (Jin et al., 2013). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B permet de renforcer ces interactions promoteurs/enhancers ce qui aboutit à engager rapidement la transcription.

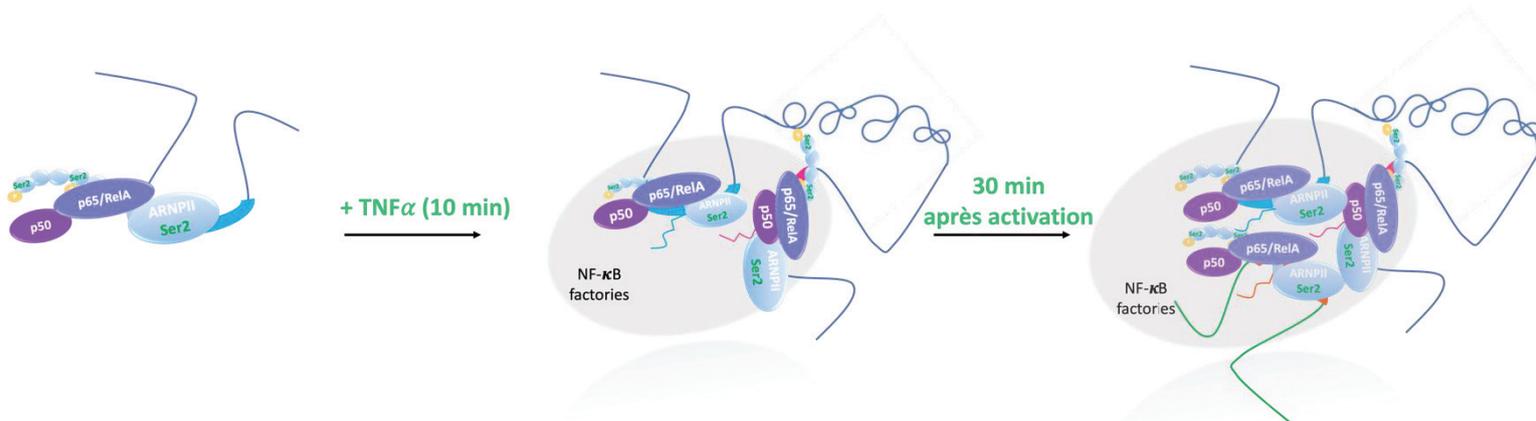
Les analyses de la conformation de la chromatine montrent que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  impacte significativement l'organisation tridimensionnelle des gènes activés transcriptionnellement. Des gènes se regroupent en foyers dans des structures nucléaires riches en facteurs de transcription et de maturation des ARNs. Ces foci sont décrits comme des usines à transcription ou « transcription factories » (Jackson et al., 1993; Rieder et al., 2012) où s'opère une coordination ou une co-régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes (Osborne et al., 2004; Schoenfelder et al., 2010). Plus particulièrement, il a été démontré par des expériences de Chromosome Conformation Capture (3C) que l'activation par le TNF $\alpha$  des cellules HUVEC est associée à la formation de « NF $\kappa$ B factories » où cohabitent les gènes cibles *SMAD4A*, *TNFAIP2* (tous les 2 au sein du chromosome 14 et distant de 50 Mpb) et *SLC6A5* (sur le chromosome 11) (Papantonis et al., 2010). L'étude au cours du temps de la cinétique de recrutement par la technologie TALEN (transcription activator-like effector nuclease) et de RNA-FISH (RNA fluorescence in situ hybridization) (**Annexe 3**) démontre une rencontre coordonnée et hiérarchisée de ces gènes au sein de l'usine transcriptionnelle : la transcription

*SAMD4A* est le premier évènement qui permet le recrutement du gène *TNFAIP2* dont la transcription est requise pour le recrutement du troisième gène *SLC6A5* (Fanucchi et al., 2013). L'inhibition expérimentale du recrutement de *TNFAIP2* au sein du complexe multigénique inhibe le recrutement et l'expression du gène *SLC6A5* (**Figure 21**).

**A****B**

## Recrutement hiérarchique des gènes au sein de la NF- $\kappa$ B factory

Expression de *SAMD4A*
 Expression de *SAMD4A*  
 +  
 Induction de l'expression *TNFAIP2*

 Expression de *SAMD4A* et *TNFAIP2*  
 +  
 Induction de l'expression *SLC6A5*


**Figure 21 : Co-régulation hiérarchique de gènes répondant au TNF $\alpha$**

A. Représentation schématique de la localisation des gènes *SAMD4A* et *TNFAIP2* sur le chromosome 14 (bleu) éloignés de 50 Mb et *SLC6A5* sur le chromosome 11 (vert). B. En réponse à la stimulation TNF $\alpha$ , les dimères NF- $\kappa$ B se déplacent dans le noyau pour réguler l'expression de leurs gènes cibles. La transcription coordonnée de ces gènes semble se produire dans des usines transcriptionnelles « NF $\kappa$ B factories ». L'un des complexes largement caractérisé est le recrutement hiérarchique des gènes *SAMD4A* (bleu), *TNFAIP2* (rose) et *SLC6A5* (orange).

### c) Arrêt de la réponse

#### (1) Rétrocontrôle négatif : Synthèse *de novo* des inhibiteurs de la voie

L'arrêt de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire. Pour cela, il existe des mécanismes de rétrocontrôle négatif permettant l'arrêt de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. L'activation prolongée de celle-ci induit l'activation transcriptionnelle des inhibiteurs de cette même voie. L'expression des gènes *NFKBIA* et *I $\kappa$ B $\epsilon$*  codant les inhibiteurs de la voie I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\epsilon$ , augmente rapidement après l'induction du facteur de transcription NF $\kappa$ B. La protéine I $\kappa$ B $\alpha$  va alors séquestrer les dimères NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme et réguler négativement l'activation de la voie. Ainsi, la synthèse *de novo* de I $\kappa$ B $\alpha$  et son import nucléaire induit le décrochage de RelA de l'ADN et son export dans le cytoplasme (Huang and Miyamoto, 2001; Johnson et al., 1999; Kearns et al., 2006; Tam et al., 2000). Bien que le décrochage des facteurs NF- $\kappa$ B des promoteurs soit suffisant à l'arrêt de la transcription, il a été suggéré que l'export dans le cytoplasme favoriserait le maintien d'un pool de complexes NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B permettant de répondre plus rapidement à une prochaine stimulation (Figure 22).

#### (2) Cinétique d'activation et défaut de l'arrêt de la réponse

Suite à une activation courte de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  dans les cellules HeLa, 3 groupes principaux de gènes induits ont été décrits : des gènes « early » dont l'expression est induite 1h après leur activation, les gènes « middle » induit 3h après, et les gènes « late » induit au moins 6h plus tard (Tian et al., 2005). Une activation prolongée au TNF $\alpha$ , a permis d'établir l'existence de deux phases d'activation des gènes NF- $\kappa$ B-dépendant mais aussi de mettre en évidence des gènes dits « biphasiques ou oscillatoires ». La seconde phase d'activation est associée à l'expression des gènes dit « late » qui codent principalement des facteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire (I-CAM, KLRC2) (Tian et al., 2005). L'étude de l'activation dans des cellules de muscle montre que l'induction de cette seconde phase est associée à une diminution de l'expression protéique des inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  (Ladner et al., 2003;

Tian et al., 2005). Une activation prolongée ou chronique de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  est caractéristique des maladies inflammatoires et des cancers par exemple.

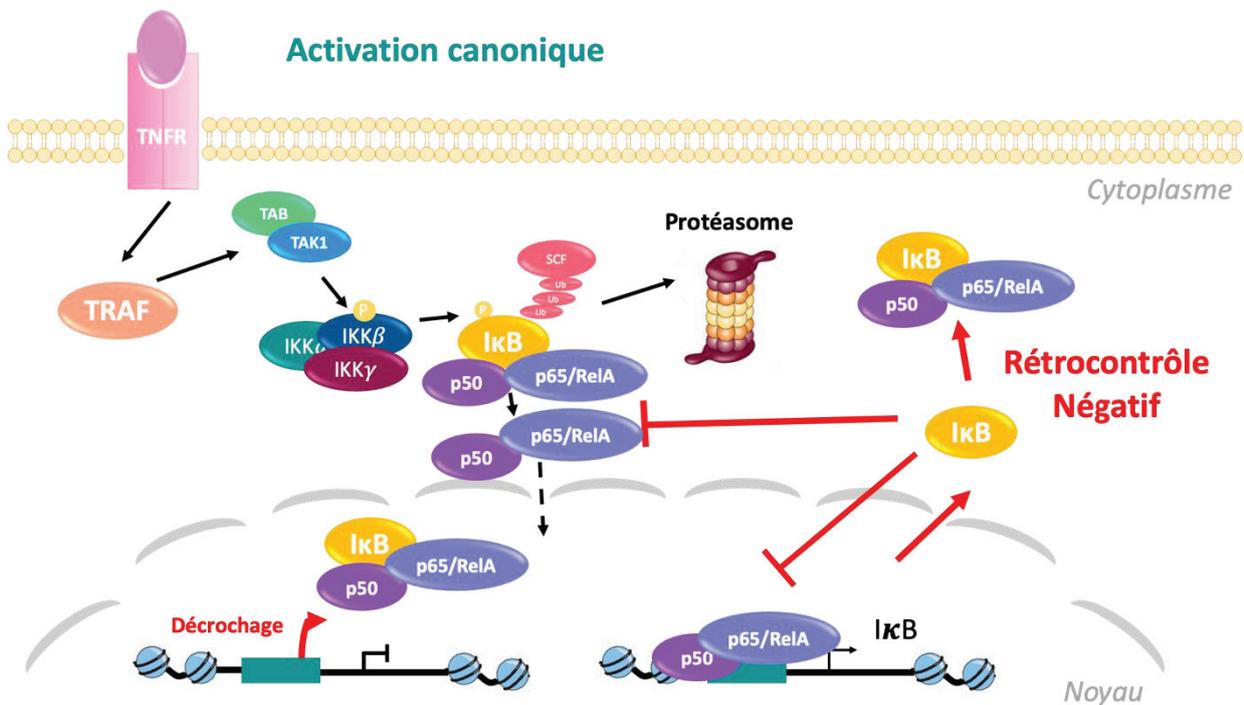


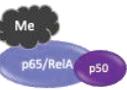
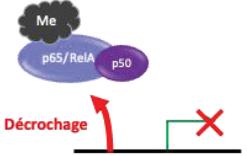
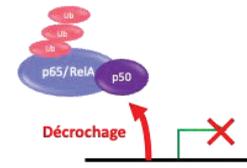
Figure 22 : Mécanisme régulant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B

Le rétrocontrôle négatif le plus connu est l'activation transcriptionnelle de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  (gènes *NFKBIA*), qui participe à l'arrêt de l'activation de la voie au niveau cytoplasmique en séquestrant les hétéromères NF- $\kappa$ B (p50-RelA/p65 et p50-c-Rel). De plus, les protéines I $\kappa$ B sont également capables de migrer dans le noyau et décrocher le facteur NF- $\kappa$ B de son site  $\kappa$ b et ainsi permettre un arrêt de la réponse (ici est schématisé l'exemple de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ ).

### (3) Modifications post-traductionnelles et arrêt de la transcription

Les modifications post-traductionnelles de la sous-unité RelA/p65 participent à l'arrêt de la transcription NF- $\kappa$ B dépendante (Table 1bis). La phosphorylation et l'ubiquitinylation de RelA/p65 peuvent induire son adressage au protéasome et sa dégradation (Saccani et al., 2003). Par ailleurs, la méthylation des lysines 314 et 315 de RelA/p65 par la méthyltransférase

Set 7/9 favorise également sa dégradation nucléaire (Yang et al., 2009). Les sites  $\kappa$ B ainsi libérés sont la cible des homodimères p50 dont un des rôles serait de réprimer la transcription des gènes cibles.

Modifications post-traductionnelles de p65/RelA	Les sites ciblés	Les enzymes modificatrices	Impact sur l'activité transcriptionnelle
<b>Phosphorylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites de phosphorylation</b> - Ser 276 - Ser 311 - Ser 468 - Ser 529 - Ser 536 - Thr 435	<b>Les kinases</b> - PKA, MSK 1/2 - PKC $\zeta$ - GSK3 $\beta$ , IKK $\epsilon$ , IKK $\beta$ - CK2 - IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , RSK1 - À définir	<b>Renforce la fixation à l'ADN</b> 
<b>Acétylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites d'acétylation</b> - K 122 - K123 - K218 - K 221 <del>K 310</del> - K 314 - K 315	<b>Les acétyltransférases</b> 	<b>K 221 et K 310</b> 
			<b>K 122 et K 123</b> 
<b>Méthylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites méthylation</b> - K218 - K 221 - K 314 - K 315	<b>Les méthyltransférases</b> - Set9 - SOCS1	
<b>Ubiquitynylation de la sous-unité p65/RelA</b> 	<b>Les sites d'ubiquitynylation</b> - K 314 - K 315	<b>Les ubiquitine ligase</b> - SOCS1	

**Table 1 bis : Modifications post-traductionnelles de RelA et leurs impacts sur la transcription**

En conclusion, l'extinction de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est strictement contrôlée à plusieurs niveaux tant elle est indispensable à l'intégrité cellulaire. La perte de ce rétrocontrôle négatif induit une activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B qui est à l'origine de pathologies inflammatoires chroniques et qui participe à l'initiation et au maintien du phénotype tumoral dans de nombreux cas de cancers (Godwin et al., 2013). Cette activité constitutive de la voie est également associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers tels que les cancers de l'estomac, de la prostate, du colon, ou encore la leucémie myéloïde chronique (Godwin et

al., 2013). Elle est souvent le résultat d'une expression et/ou d'une activité aberrante des effecteurs de la voie tel que RelA.

## B. Activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules infectées par le virus HTLV-1

### 1. Au niveau cytoplasmique

Les premières études ont révélé que la voie NF- $\kappa$ B est activée de manière constitutive dans les lignées cellulaires transformées par HTLV-1 et dans les ATL (Mori et al., 1999; Sun et al., 1994). L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B dans ces cellules déclenche l'apoptose, démontrant l'importance de cette voie de signalisation dans le maintien du phénotype tumoral (Mori et al., 2002; Watanabe et al., 2005).

#### *a) Rôle de Tax dans l'activation constitutive de la voie NF $\kappa$ B*

L'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B est une étape cruciale et nécessaire à la transformation cellulaire médiée par le virus HTLV-1 (Robek and Ratner, 1999). Il a été rapidement démontré que Tax est un acteur majeur dans ce processus qui suffit à immortaliser les lymphocytes T primaires humains (Leung and Nabel, 1988; Robek and Ratner, 1999; Ruben et al., 1988; Yamaoka et al., 1996). Tax intervient en réalité à diverses étapes des mécanismes de contrôle de la voie NF- $\kappa$ B canonique et non canonique (Shirinian et al., 2013).

#### (1) Activation de la voie canonique par Tax

Au niveau du cytoplasme, Tax est capable d'activer la voie canonique en s'associant directement à la protéine NEMO (Harhaj et al., 1999). *In vitro*, l'interaction entre Tax et NEMO nécessite le recrutement de kinases par Tax afin de permettre l'activation du complexe IKK (Harhaj et al., 1999) (Harhaj and Sun, 1999; Jin et al., 1999; Kfoury et al., 2005). Plusieurs kinases

ont été identifiées comme interagissant avec Tax, notamment NIK (Uhlik et al., 1998; Yin et al., 1998), MEKK1 ou encore TAK1 (via la sous-unité TAB2).

De plus, le détournement du complexe LUBAC et RNF8 (E3 ubiquitine ligase) par Tax permet de promouvoir l'oligomérisation et la phosphorylation de TAK1 et IKK. Tax est capable également d'interagir avec I $\kappa$ B $\alpha$  par le biais de ses motifs ankyrines répétés. Cette interaction favorise l'adressage de I $\kappa$ B $\alpha$  au protéasome et sa dégradation (Hirai et al., 1994; Suzuki et al., 1995). Tax se lie à la sous unité 20S du protéasome pour renforcer sa liaison avec les protéines I $\kappa$ B et favorise leur dégradation (Rousset et al., 1996). Tax permet également la maturation protéolytique de p105 pour générer la sous-unité p50. L'ensemble de ces actions aboutit à l'augmentation du nombre de complexes NF- $\kappa$ B libres (notamment l'hétérodimère p50/RelA) qui peuvent subir un import nucléaire.

Au niveau de la chromatine, les fonctions de Tax sont relativement peu décrites. Tax augmente la formation et la fixation des dimères NF- $\kappa$ B au niveau des sites  $\kappa$ B sans pour autant impacter leur dissociation de l'ADN (**Figure 23**) (Petropoulos et al., 1996). La présence de Tax au niveau des complexes NF- $\kappa$ B à la chromatine reste incertaine. Seule une étude *in vitro* par EMSA (Electrophoresis mobility shift assay ou gel retard) montre que Tax pourrait s'associer au complexe NF- $\kappa$ B/ADN, cependant ces données n'ont pas été vérifiées dans un contexte chromatinien *in vivo* (Suzuki et al., 1994).

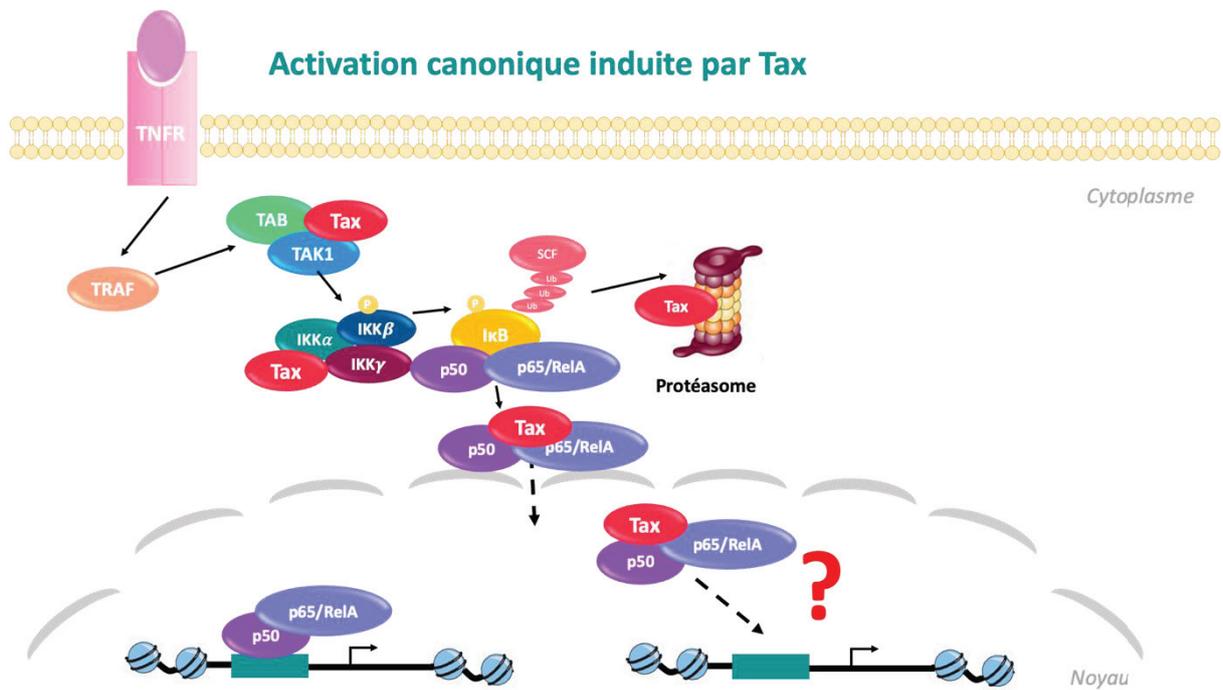


Figure 23 : Schéma d'activation de la voie canonique par Tax

## (2) Activation de la voie non canonique

En ce qui concerne la voie non canonique, l'interaction Tax-NEMO induit le recrutement des sous-unités IKKα entraînant la phosphorylation de p100 et son clivage en p52 (Lanoix et al., 1994 ; Qu et al., 2004) (Figure 24).

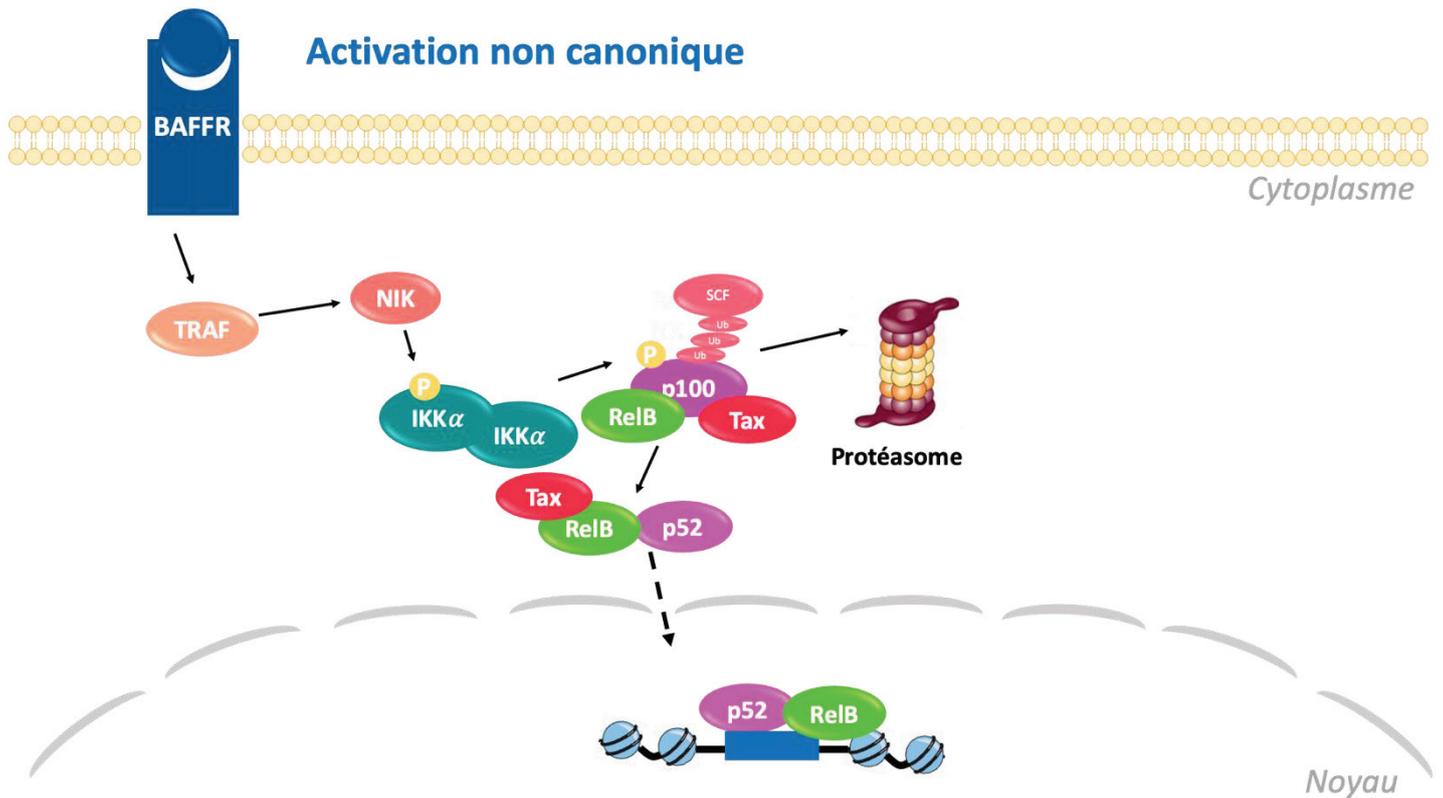


Figure 24 : Schéma d'activation de la voie non canonique par Tax

### (3) Rôle de la protéine NEMO

Les voies canoniques et non-canoniques ne sont pas en réalité totalement indépendantes l'une de l'autre. La protéine NEMO participe à l'activation de ces deux voies. Il est important de noter que Tax n'est pas capable d'activer la voie NF- $\kappa$ B dans des cellules Jurkat NEMO  $-/-$  suggérant ainsi que la protéine NEMO est un élément clé de l'action de Tax dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Le mutant Tax M22, porteur des mutations T130A et L131S et incapable d'interagir avec NEMO, est déficient pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Tax M22 n'induit pas la transformation maligne des cellules T contrairement au Tax sauvage (Tax WT) (Robek and Ratner, 1999).

#### (4) Rôle de l'ubiquitylation dans l'activation cytoplasmique de la voie NF- $\kappa$ B

L'oncoprotéine Tax est soumise à des modifications post-traductionnelles qui influencent sa localisation cellulaire et ses capacités d'activation de la voie NF- $\kappa$ B. L'ubiquitylation de Tax a été décrite comme étant importante pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et le recrutement du facteur IKK $\gamma$ /NEMO. Le mutant de lysines Tax-K4-8R est incapable d'interagir avec le complexe IKK (Nasr et al., 2006). Par ailleurs, l'activation du complexe IKK par Tax a été montrée dépendante de la polyubiquitylation de Tax au sein des radeaux lipidiques (Rafts) (Huang et al., 2009; Shembade et al., 2007). Les études actuelles suggèrent d'autres mécanismes pour expliquer l'activation du complexe IKK par Tax mais ceux-ci sont encore très controversés. L'activation chronique serait induite de manière synergique entre l'activation reliée à Tax et une activation secondaire médiée par les effets autocrines et paracrines des cytokines sécrétées. Afin d'évaluer l'effet direct de Tax, Wang et al. ont mis en place un système d'étude *in vitro*. Ces données montrent une activité ubiquitine ligase de Tax qui via UbcH2, UbcH5c ou UbcH7 catalyse l'assemblage de chaînes de poly-ubiquitine. Ces chaînes favorisent ainsi l'activation directe de Tax sur IKK en se liant à la sous-unité IKK $\gamma$ /NEMO. Tax est aussi capable d'interagir avec Ubc13, NEMO, TAX1BP1 et NRP/OPTINEURIN au sein des Rafts et l'établissement de ce complexe permet l'activation du complexe IKK. En parallèle, le recrutement de l'oncoprotéine Tax au sein des Rafts est également associé à une dérégulation de l'autophagie. Tax favorise ici l'interaction entre le complexe IKK, Beclin1 et PI3KC3 contribuant ainsi à l'assemblage de l'autophagosome (Chen et al., 2015; Ren et al., 2015).

#### (5) La phosphorylation et l'acétylation de Tax sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle des gènes NF- $\kappa$ B dépendants.

La forme phosphorylée de Tax est la première modification post-traductionnelle à avoir été découverte. Elle est nécessaire pour sa localisation nucléaire au niveau des corps nucléaires et l'activation transcriptionnelle dépendante de la voie NF- $\kappa$ B (**Figure 23**). Le mutant Tax F1, qui ne peut pas être phosphorylé au niveau des sérines 300 et 301, s'accumule dans le cytoplasme

et empêche la formation des corps nucléaires Tax (Tax bodies) (Bex et al., 1997). La perte de phosphorylation de Tax au niveau de ces résidus prévient également son acétylation au niveau de la lysine 346 (**Figure 25**) (Lodewick et al., 2009). Cette étude suggère également que la sumoylation de Tax potentialise son acétylation, permettant la colocalisation de Tax acétylée et sumoylée avec p300 au sein des corps nucléaires. De plus, l'interaction entre p300 et Tax acétylée permet l'activation des gènes NF- $\kappa$ B dépendants (Lodewick et al., 2009).

La sumoylation de Tax a ainsi été proposée comme étant nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes de la voie NF- $\kappa$ B. Cependant, via l'utilisation d'un mutant PQ et d'un siRNA dirigé contre Ubc9 (SUMO-conjugating enzyme), deux travaux de l'équipe de Claudine Pique révèlent que la perte de sumoylation de Tax n'impacte pas l'activation du rapporteur d'expression répondant aux facteurs NF- $\kappa$ B, ni l'activation du gène cellulaire ICAM-1 dont l'activation est dépendante de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Bonnet et al., 2012; Pène et al., 2014). La sumoylation de Tax semble plutôt être indispensable à sa localisation au niveau des corps nucléaires.

### Activation transcriptionnelle des gènes cibles NF- $\kappa$ B

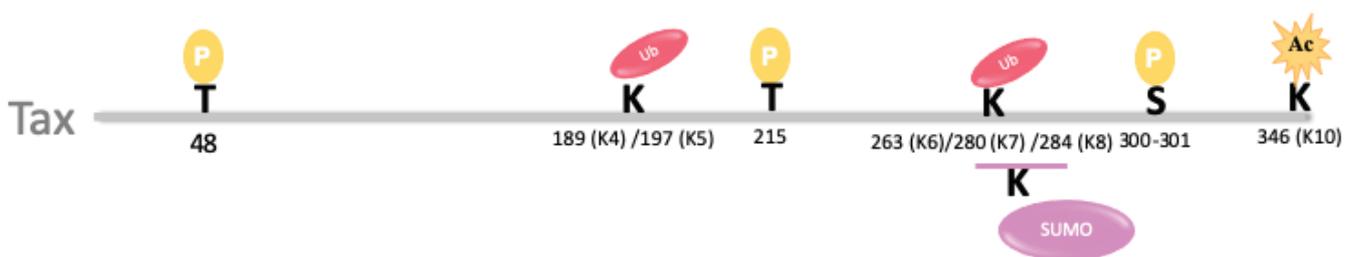


Figure 25 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de Tax impliquées dans l'activation transcriptionnelle des gènes dépendant de la voie NF- $\kappa$ B

## 2. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax induit la sénescence cellulaire

Quatre études de l'équipe de Chen-Zou Giam révèlent que l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax est associée à une entrée en sénescence des cellules (Kuo and Giam, 2006; Shudofsky and Giam, 2019; Zhao et al., 2009; Zhi et al., 2011). Cette hyperactivation de la voie s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire et plus précisément d'un blocage en G1 qui conduit à l'entrée en sénescence. La sénescence des cellules Tax positives est dépendante de la translocation nucléaire de p65/RelA et de l'activation d'IKK $\alpha$ . Elle se traduit par la transactivation de p27<sup>KIP</sup> médiée par l'activation prématurée du complexe APC induite par Tax. La surexpression du gène p21 est dépendante de la fixation à son promoteur du facteur SP1 induit par Tax. Ce phénotype est perdu en utilisant des lignées HeLa exprimant un dominant négatif I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ BSR), qui ne peut pas être dégradé par le protéasome induisant ainsi la séquestration des dimères NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. Les cellules délétées pour les protéines IKK $\alpha$ , IKK $\gamma$  et NIK ne sont protégées de l'entrée en sénescence médiée par Tax. Aussi, l'expression de l'oncoprotéine HBZ (ayant été décrite comme inhibitrice de la voie canonique) permettrait de prévenir l'apparition de la sénescence cellulaire médiée par Tax. HBZ affiche en effet des fonctions antagonistes à celles de Tax. Elle est capable d'interagir avec le RHD de la sous unité RelA/p65 contribuant ainsi à une diminution de son interaction avec l'ADN (Zhao et al., 2009). HBZ induit aussi l'augmentation de l'expression de l'E3 ubiquitine ligase favorisant la dégradation de RelA/p65 par le protéasome (Zhao et al. 2009). Dans les cellules d'ATL, il semble exister une résistance à l'induction de la sénescence induite par Tax (Shudofsky and Giam, 2019). Il est proposé que les lignées dérivées d'ATL ou Tax a été transduit acquièrent des mutations et des modifications épigénétiques qui leur permettent d'échapper à la sénescence cellulaire médiée par l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B (Shudofsky and Giam, 2019)

Cependant aucune donnée n'existe concernant l'effet sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B suite à la transduction de Tax dans les lignées cellulaires dérivée d'ATL ainsi que son impact sur l'expression des gènes p21 et p27. Une hypothèse envisageable serait que la voie NF- $\kappa$ B ne puisse pas être activée davantage et que par conséquent Tax serait dans l'incapacité d'induire l'entrée en sénescence. Aucune évidence à l'heure actuelle ne permet d'affirmer que des

cellules infectées par HTLV-1 *in vivo* induisent la surexpression de ces gènes et l'induction de la sénescence décrite *in vitro*.

Les travaux du groupe de Chen-Zou Giam posent de nouvelles questions : quelles sont les altérations génétiques et épigénétiques qui pourraient prévenir l'entrée en sénescence ? De plus, quel serait le lien entre l'entrée en sénescence, l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B et l'instabilité génomique induite par Tax qui favorise l'aneuploïdie et l'apparition de mutations somatiques ?

Une étude *ex vivo* montre que les cellules T infectées et non-infectées issues d'individus porteurs du HTLV-1 portent des caractéristiques de sénescence comparées aux cellules T de donneurs (Zane et al., 2012). Ce phénotype a été relié à des dysfonctions du système télomère/téломérase qui dépendent du phénotype T CD4+ ou CD8+, du niveau d'expression de Tax et de l'état d'activation des cellules T. Le raccourcissement des télomères au cours de l'activation des lymphocytes est en effet l'un des principaux facteurs impliqué dans la sénescence (Chebel et al., 2009). En outre, Tax réprime l'expression des gènes contrôlant l'intégrité télomérique (Gabet et al., 2003; Zane et al., 2012) et installe un contexte d'instabilité chromosomique propice à la transformation maligne. Dans les cellules d'ATL, ces dysfonctions sont moins marquées du fait de la perte de Tax et de la présence d'HBZ qui permet la surexpression de la télomérase (Kuhlmann et al., 2007) et une régulation des télomères appropriée à la stabilisation du génome tumoral. Le rôle du système télomère/téломérase dans la sénescence induite par l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules Tax n'a pas été abordé dans les travaux de Giam.

Ainsi, une sénescence générée par Tax et régulée par HBZ pourrait participer aux étapes précoces des processus leucémogènes associés à HTLV-1.

## C. Rôle de l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B induite par Tax dans l'expression génique

### 1. Au niveau quantitatif

L'essentiel des effets de Tax sur l'activation transcriptionnelle liée à NF- $\kappa$ B a été étudié au niveau de promoteurs. De nombreux travaux gène à gène via notamment l'utilisation de constructions luciféras ont été menés afin d'étudier l'effet de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax au niveau des promoteurs des gènes cellulaires (Huang et al., 2017; Lavorgna et al., 2014; Leung and Nabel, 1988; Mariner et al., 2001; Pise-Masison et al., 2000; Ruben et al., 1988). Notamment, il a été démontré que l'expression des gènes *IL21*, *IL2RA*, *IL15* et TP53 est activée par Tax via une région comprenant le motif  $\kappa$ B 5' GGGGAATCTCCC 3' (Leung and Nabel, 1988; Mariner et al., 2001; Pise-Masison et al., 2000; Ruben et al., 1988). Par ailleurs, Tax promeut également la surexpression du récepteur interleukine IL-17RB. Cette expression anormale d'IL-17RB favorise aussi l'activation persistante de la voie NF- $\kappa$ B. (Lavorgna et al., 2014).

L'analyse du transcriptome à l'échelle de la cellule unique exprimant Tax révèle la surexpression des gènes anti-apoptotiques et des gènes cibles de la voie NF- $\kappa$ B (Mahgoub et al., 2018). L'analyse intégrative des données de ChIP-seq H3K27ac (marque d'activation de la transcription) et des RNA-seq montre un enrichissement de cette marque d'activation transcriptionnelle au sein des gènes transactivés par Tax de manière NF- $\kappa$ B dépendante (*IL2RA*, *TRAF3*, *TNFRSF8*, *PHF13*) (Kurita et al., 2018; Mahgoub et al., 2018).

À large échelle, l'analyse par ATAC-seq permettant l'étude des régions accessibles de la chromatine (**Annexe3**) montre que les motifs de la famille NF- $\kappa$ B et de la famille AP-1 (JunB, Fra1, Fra2, par exemple) sont enrichis de manière significative dans les régions ouvertes de la chromatine dans les cellules Tax positives, ce qui est cohérent avec les résultats des analyses RNA-seq. Ces résultats suggèrent que les cellules qui expriment Tax sont associées à un remodelage important de la chromatine, facilitant l'accès des dimères NF- $\kappa$ B et AP-1 à leurs

sites de fixation spécifiques. En dehors des cellules exprimant Tax, des analyses à large échelle de la distribution chromatinienne de RelA suite à une activation exogène par TNF- $\alpha$  ou LPS révèlent que les promoteurs ne constituent en réalité qu'une petite partie des régions ciblées par cette sous-unité de NF- $\kappa$ B. Une grande majorité est retrouvée dans le corps de gènes incluant des exons et des introns. L'impact fonctionnel de la fixation intragénique de NF- $\kappa$ B n'a pas été exploré jusqu'à présent et pourrait être le reflet d'un tout autre rôle de RelA que celui initialement décrit dans le contrôle de l'activité des promoteurs.

## 2. Au niveau qualitatif

L'effet de Tax sur la maturation des ARN cellulaires est relativement peu décrit. Tax a été montrée comme interférant avec la machinerie NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) (Fiorini et al., 2018; Mocquet et al., 2012). Le NMD est une voie de régulation qualitative des transcrits qui possède un codon de terminaison prématuré. Cet ARN non fonctionnel sera alors dégradé par la machinerie NMD aboutissant en une baisse de l'expression protéique. Tax se lie à UPF1 au niveau de son domaine hélicase central réduisant ainsi son affinité pour les ARNs cibles qui possèdent un codon STOP prématuré. Par cette action, Tax favorise la stabilisation des ARNm viraux ainsi que certains ARNm cellulaires (Fiorini et al., 2018). Par ailleurs, Tax participe à l'expression d'isoformes d'épissage des transcrits *Il-6* et *Bcl-xL* qui sont également retrouvés chez les patients ATL et TSP/HAM. Ces isoformes d'épissage sont exprimés de façon NF- $\kappa$ B dépendante dans lignées cellulaires lymphoïdes Tax positives (JPX9 et CTLL4-Tax) (Nakashima et al., 2003; Tsukahara et al., 1999). Le mutant TaxM22 déficient pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ne permet pas la surexpression de BCL-xL (Tsukahara et al., 1999). Ces données suggèrent que l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax module le transcriptome cellulaire tant au niveau quantitatif que qualitatif. Ces effets pourraient être reliés à une redistribution de NF- $\kappa$ B dans le corps des gènes régulés en épissage alternatif.

## IV. L'épissage alternatif : un mécanisme de régulation de la diversité structurale des transcrits cellulaires couplés à la transcription

### A. Qu'est-ce que l'épissage ?

L'épissage des ARN pré-messagers (pré-ARNm) est une étape nécessaire pour l'obtention de la grande majorité des ARN messagers (ARNm) matures chez les organismes eucaryotes. Il consiste à exciser les séquences introniques présentes dans le pré-ARNm et à ligaturer les exons ensemble. Les facteurs d'épissage s'organisent séquentiellement en macrocomplexe appelé spliceosome. À l'issue de son épissage, l'ARNm est exporté dans le cytoplasme où il est pris en charge par les ribosomes pour sa traduction. Chez l'homme, la plupart des introns sont épissés co-transcriptionnellement.

#### 1. Les sites d'épissages

Comment les introns et les exons sont-ils reconnus par le spliceosome ? Il existe quatre séquences de reconnaissance des exons et des introns : le site 5' d'épissage, la région du point de branchement, une région riche en pyrimidines et le site 3' d'épissage. Les sites 5' et 3' canoniques d'épissage sont respectivement les di-nucléotides GT et AG, définissant ainsi les extrémités de l'intron. Une autre région importante pour l'épissage est le point de branchement. Cette séquence est localisée généralement entre 20 et 40 nucléotides (nt) en amont du site 3' d'épissage et contient une adénosine. Chez les eucaryotes supérieurs, une région riche en pyrimidines, existe entre le point de branchement et le site 3' d'épissage (Figure 26).



Figure 26 : Les sites de reconnaissance nécessaires à la détection de l'intron/exon par le spliceosome

Séquences consensus d'épissage (ADN) : 5'SS (site donneur d'épissage), BP (point de branchement), PPT (polypyrimidine tract ou séquence riche en pyrimidine) et 3'SS (site accepteur d'épissage).

## 2. Assemblage du splicéosome et réaction d'épissage

Le splicéosome se compose de plus de 200 protéines associées ou non à des petites ribonucléoprotéines, les snRNP (Small nuclear ribonucleoprotein) U1, U2, U4/U6 et U5. Ce macro-complexe assure les deux réactions consécutives de transestérification nécessaires à l'excision de l'intron à la liaison entre les deux exons (**Figure 27**). L'assemblage du splicéosome est dépendante de séquences ARN reconnues par les snRNP U1 et U2. En effet, U1 snRNP se lie d'abord à la jonction du site d'épissage de 5'ss, tandis que SF1 (facteur d'épissage 1) et les facteurs auxiliaires U2 (U2AF) reconnaissent le point de branchement et le site d'épissage de 3'ss, respectivement (**Figure 28**). Par la suite, U2 snRNP déplace SF1 et U2AF pour se lier au point de branchement. Ainsi se met en place la première étape de transestérification médiée par le recrutement du complexe U4/U6 et U5 snRNP (tri- snRNP), qui forme le complexe pré-catalytique (B complexe) en associant avec U1 et U2 snRNP. Le splicéosome subit ensuite plusieurs remodelages pour former un complexe catalytique (complexe B\*). Au cours de ce remodelage, U1 et U4 snRNP sont retirés du complexe. La formation du lariat (intron en forme de boucle) se produit lors de l'attaque de l'adénosine du point de branchement par le site 5'SS. Au cours de la seconde étape (ligation des exons), l'extrémité libre du site 3'ss de l'exon est jointe à l'extrémité de 5' de l'exon suivant par une deuxième réaction de transestérification.

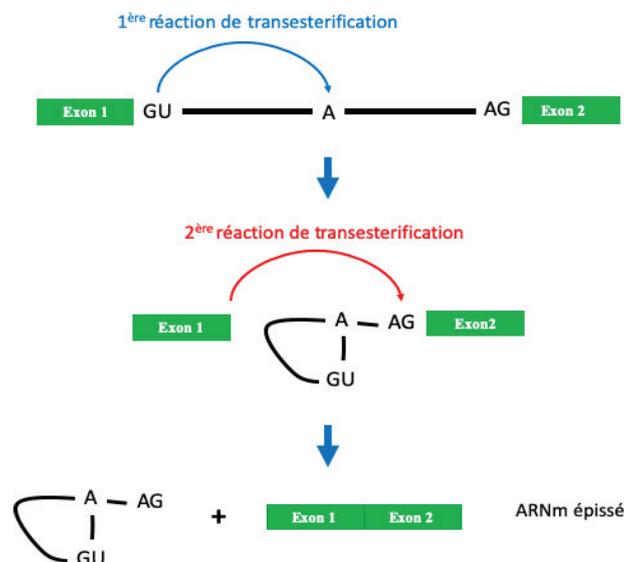
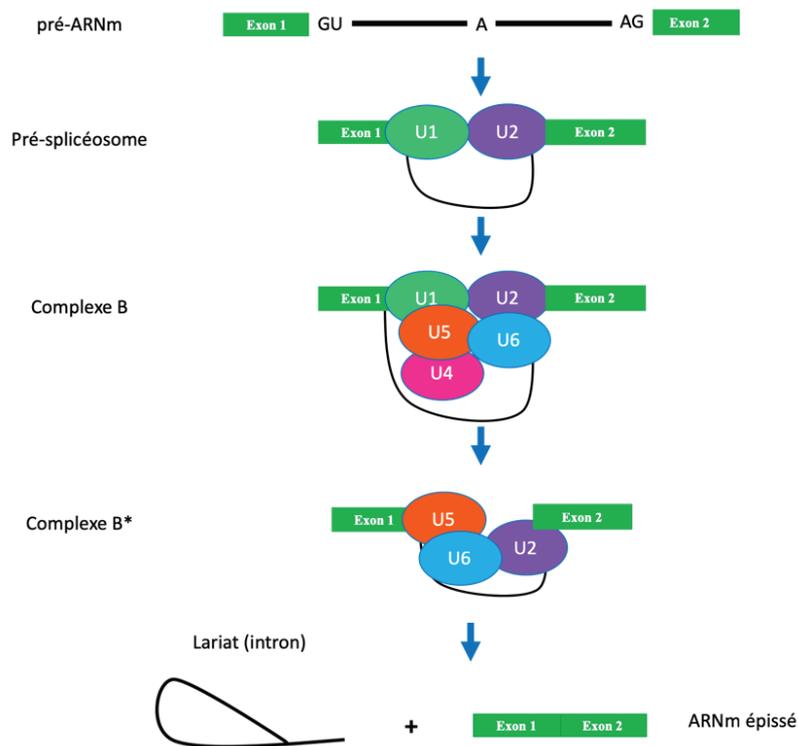


Figure 27 : Schéma des deux réactions de transestérification



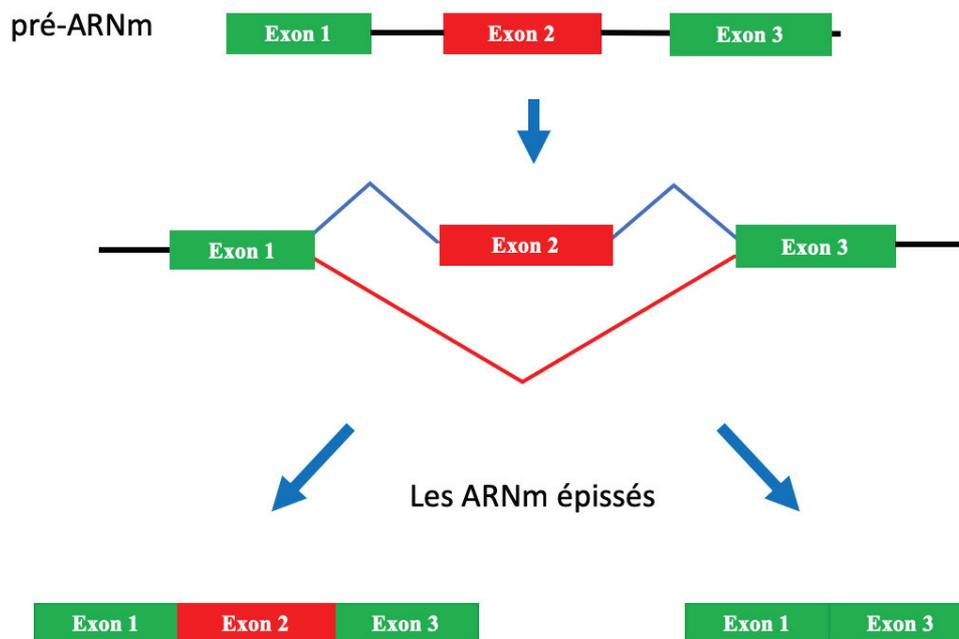
**Figure 28 : Les étapes d'assemblage du splicéosome**

La première étape de l'assemblage du splicéosome consiste en la reconnaissance du site 5' par le snRNP U1. Puis le snRNP U2 vient se lier au site de branchement et forme le pré-splicéosome. Le complexe B se met en place grâce à la fixation du tri-snRNP U4/U6-U5 entre U1 et U2. Après la libération des snRNPs U1 et U4, la première réaction de trans-estérification a lieu. Le site 5' est clivé et le résidu en 5' de l'intron est lié à une séquence proche du site 3' (complexe B\*). La deuxième réaction de trans-estérification consiste à cliver le site 3', suite à cela les exons sont liés entre eux et l'intron est sous forme de lasso ou lariat.

Depuis la première caractérisation du splicéosome en 1977, les techniques d'études des complexes protéiques en chromatographie d'affinité et spectrométrie de masse révèlent que la composition du splicéosome est plus complexe qu'attendu. Il comporte, outre les facteurs d'épissage, des régulateurs de la chromatine et de la transcription (Rappsilber et al., 2002). Ces données soulignent un couplage étroit entre l'épissage et la transcription, ces deux événements se déroulant au même moment et au même endroit, sont intimement coordonnés (Naftelberg et al., 2015). Notamment, les hélicases à ARN DDX5 et DDX17 ont été décrites comme jouant un rôle à l'interface de la transcription et de l'épissage (Dardenne et al., 2014; Lin et al., 2005a; Rappsilber et al., 2002). Leurs fonctions seront développées en détail dans un prochain chapitre.

## B. L'épissage Alternatif

L'épissage alternatif est le processus selon lequel un gène peut produire différents ARNm matures par la combinaison alternative d'exons. Ce mécanisme, étroitement lié au contexte cellulaire, est au cœur de la diversité du transcriptome et du protéome cellulaire (**Figure 29**).

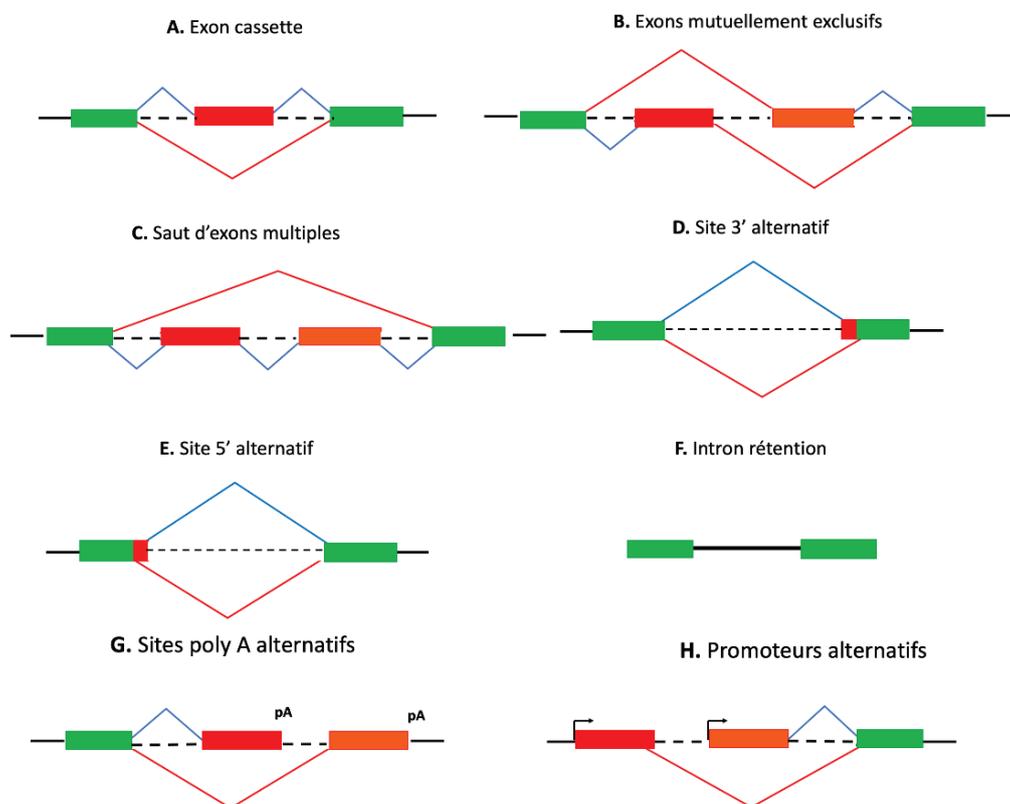


**Figure 29 : Exemple d'épissage alternatif**

Schéma explicatif simplifié de l'épissage alternatif. L'épissage alternatif est le processus par lequel un même transcrit primaire peut former au moins deux molécules d'ARN différentes. Un exon est dit alternatif s'il est retrouvé inclus ou exclu au sein de l'ARNm mature. Un gène peut ainsi produire plusieurs ARNm et par conséquent différentes isoformes protéiques dont leurs fonctions peuvent diverger.

Les événements les plus courants sont les exons cassettes ou ASE (alternative splicing events). L'exon est soit inclus soit exclu de l'ARN messager mature. Deux exons consécutifs sont dits mutuellement exclusifs si l'un est toujours exclu dans l'ARNm lorsque l'autre est inclus. Deux autres événements d'épissage alternatif correspondent à la sélection différentielle de sites d'épissage respectivement donneur (en 5') et accepteur (en 3'). En fonction du site d'épissage sélectionné, un fragment de l'exon est inclus ou exclu de l'ARNm. La rétention d'intron correspond à l'inclusion d'un intron dans l'ARNm (**Figure 30**).

De plus, il existe des sites d'initiation ou de polyadénylation alternatifs de la transcription qui modulent le choix de l'inclusion du premier ou du dernier exon qui sont respectivement appelés promoteurs alternatifs et sites de polyadénylation alternatifs (**Figure 30**). Les analyses bio-informatiques ont permis de définir la notion de force des sites d'épissage basée sur le degré de similarité des séquences avec leur consensus. Les exons dit « alternatifs » portent des sites d'épissage faibles ou dégénérés et par conséquent sont faiblement reconnus par le splicéosome. La reconnaissance et le choix de ces sites dépendent de l'intervention d'autres éléments régulateurs recrutés en trans à la chromatine ou à l'ARN au niveau exonique ou intronique.



**Figure 30 : Schéma des différents types d'épissage alternatif**

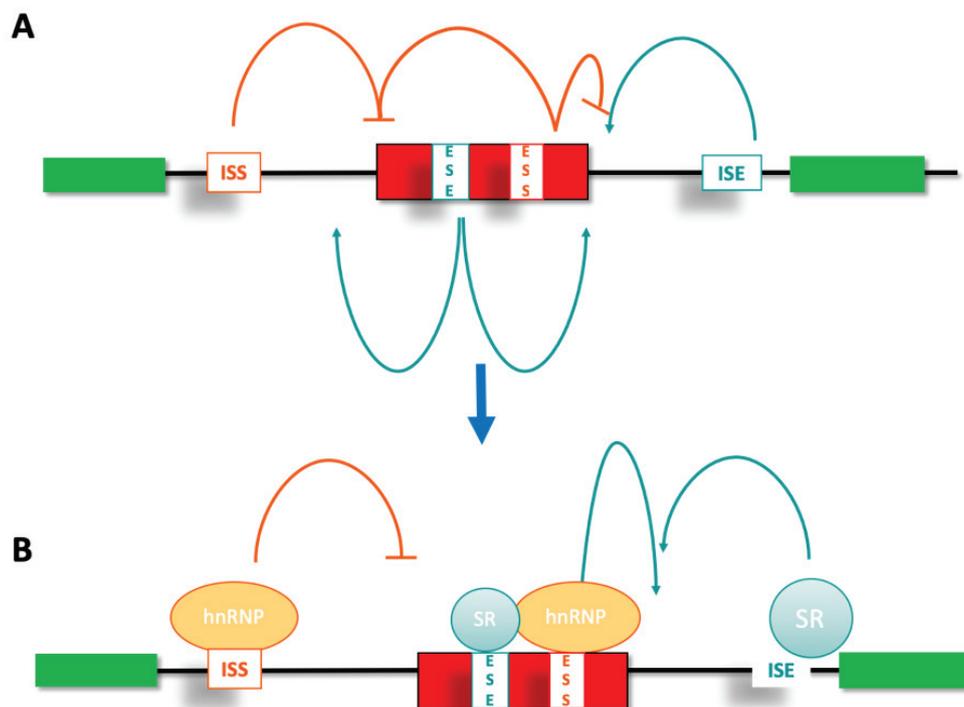
En rouge et orange : exon (ou portion d'exon) alternativement inclus(e) ou exclu (e) dans l'ARN messager mature.

## 1. Les facteurs d'épissage et leurs séquences de régulation

La régulation de l'épissage alternatif s'effectue de manière coordonnée entre les séquences cis (séquence d'ADN capable de moduler l'épissage d'un exon donné) et les facteurs agissant en trans sur les séquences régulatrices d'épissage ou facteurs d'épissage.

### *a) Les séquences régulatrices de l'épissage alternatif*

Il existe 4 catégories d'éléments cis : les séquences exoniques activatrices ou ESE (Exonic Splicing Enhancer), les séquences exoniques inhibitrices ou ESS (Exonic Splicing Silencer), les séquences introniques activatrices ou ISE (Intronic Splicing Enhancer) et enfin les séquences introniques inhibitrices ou ISS (Intronic Splicing Silencer) (**Figure 31A**). Il existe deux grandes familles de facteurs d'épissage qui régulent en trans l'inclusion ou l'exclusion des exons alternatifs (**Figure 31 B**) : les facteurs SR et les hnRNPs.

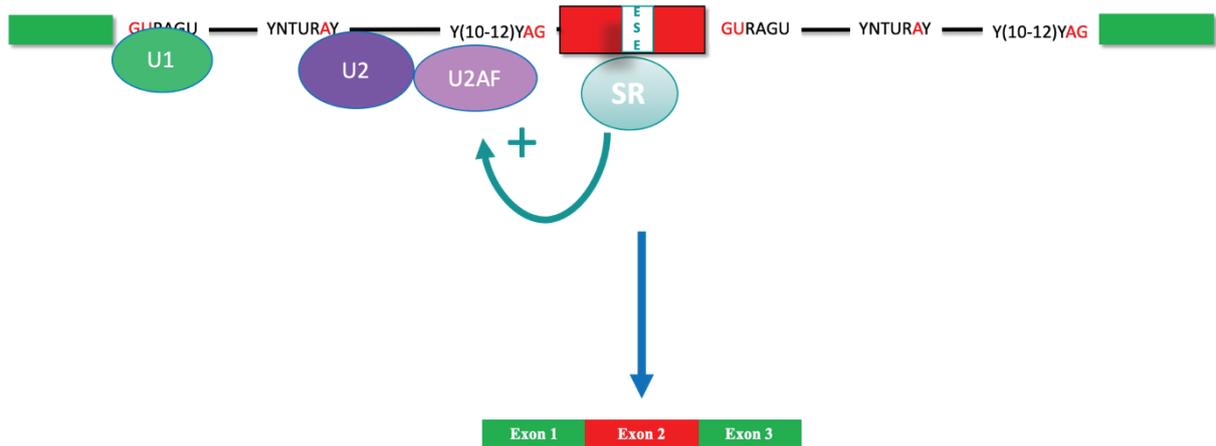


**Figure 31 : Régulation de l'épissage alternatif**

A. Séquences cis-régulatrices de l'épissage alternatif nommées d'après leur position (exon ou intron) et leur activité (répresseur ou activateur) : ISS (intronic splicing silencer), ESE (Exonic splicing enhancer), ESS (Exonic splicing silencer) et ISE (intronic splicing enhancer). B. Les facteurs d'épissage (trans-régulateurs) interagissent avec les séquences cis-régulatrices pour promouvoir l'inclusion ou l'exclusion de l'exon. Les deux familles de facteurs de régulation de l'épissage les plus étudiés sont les protéines hnRNP (en orange) et les protéines SR (en vert).

### *b) Les protéines SR*

Cette famille comporte 9 membres dit « canoniques », considérés comme des protéines activatrices de l'épissage. Elles sont caractérisées par un domaine RS (riche en Sérine et Arginine) et un domaine de liaison à l'ARN (domaine RRM). Ce domaine RRM reconnaît des ESE et ISE spécifiques à chaque protéine SR. Ainsi ces protéines SR sont connues pour stabiliser snRNP U1 au site d'épissage 5' et le facteur U2AF au site d'épissage 3' via leur domaine RS (**Figure 32**). Elles facilitent également l'incorporation de la tri-snRNP U4/U6-U5 au cours de l'assemblage du splicéosome (Rosigno and Garcia-Blanco, 1995).

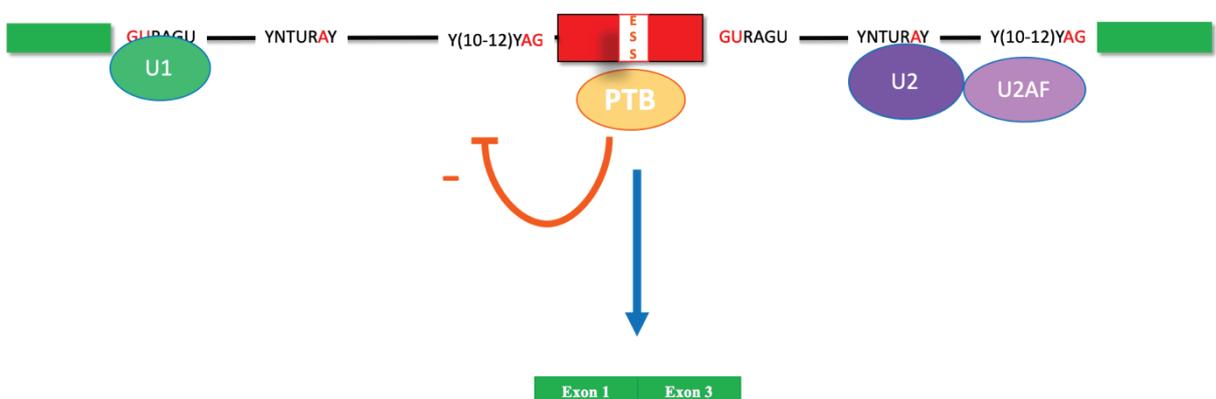


**Figure 32 : Schéma de régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR**

Les protéines SR se fixe sur les séquences activatrices ici ESE (Exonic splicing enhancer) favorisant ainsi la reconnaissance des sites d'épissage et le recrutement des snRNP U1 et U2.

### c) *Les protéines hnRNPs*

Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNPs) représentent une grande famille de protéines de liaison à l'ARN (RBP) qui participent, à différents niveaux, au métabolisme et à la maturation des ARN incluant l'épissage alternatif, la stabilisation de l'ARNm d'une part, et à la régulation de la transcription et de la traduction d'autre part. Ces protéines hnRNPs possèdent des caractéristiques communes, mais elles sont plus hétérogènes que leurs contreparties SR. Elles possèdent également un domaine RRM, souvent associé à une répression de l'inclusion de l'exon. L'une des protéines hnRNPs la plus étudiée est PTB qui interagit avec la séquence riche en pyrimidines en amont du site 3' d'épissage bloquant ainsi l'accès au complexe U2AF (Figure 33).



**Figure 33 : Schéma de régulation de l'épissage alternatif par les protéines hnRNPs (PTB)**

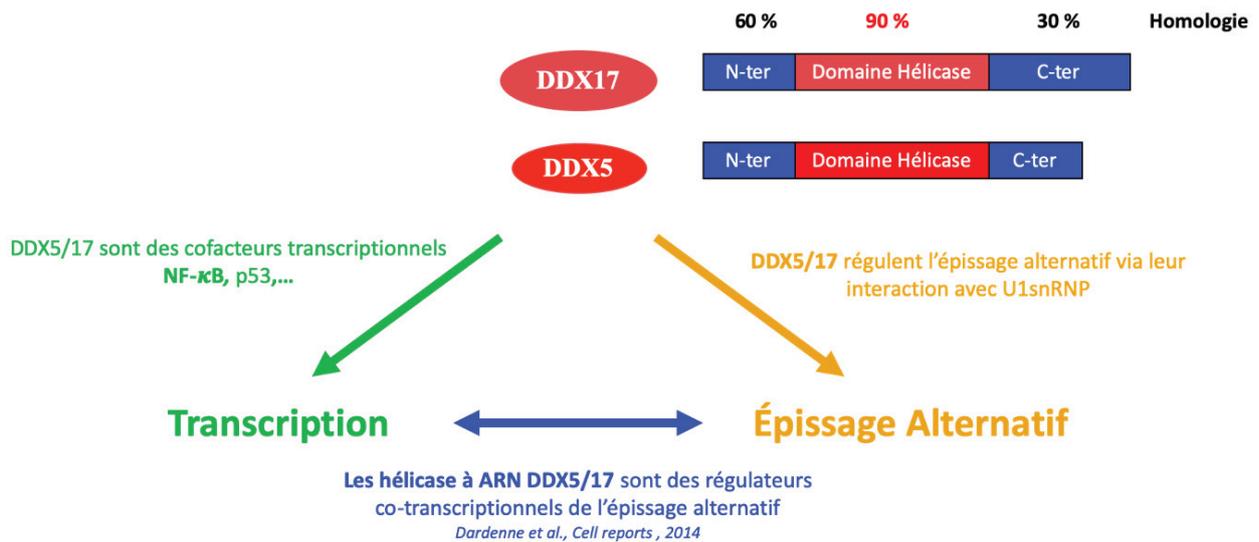
Lorsque le facteur PTB se fixe au niveau de ESE, il empêche la reconnaissance du site d'épissage et le recrutement de U2 et U2AF induisant ainsi l'exclusion de l'exon cible.

## 2. Les structures secondaires des transcrits

La sélection des sites d'épissage peut être également modulée par la présence de structures secondaires de l'ARN. En effet, ces structures secondaires peuvent masquer les sites d'épissage et ainsi empêcher leur reconnaissance par le spliceosome. Elles peuvent également favoriser l'inclusion de l'exon en empêchant le recrutement par un facteur d'épissage répresseur et/ou en rapprochant des séquences régulatrices (Jin et al., 2011). Ces structures ont été également impliquées dans le recrutement de facteurs d'épissage (Grover et al., 1999; Hiller et al., 2007; Vargas et al., 2011). Ces structures secondaires de l'ARN peuvent être déroulées par les hélicases à ARN qui comme leur nom l'indique exercent une activité enzymatique permettant d'ouvrir les hélices à ARN. Plusieurs hélicases ont été impliquées dans la réaction et la régulation de l'épissage (Camats et al., 2008; Hönig et al., 2002a; Kar et al., 2011). Nous allons ici plus particulièrement nous intéresser aux hélicases à ARN DDX5 et DDX17.

## 3. Les hélicases à ARN DDX5 et DDX17

Les hélicases à ARN DDX5 (p68) et DDX17 (p72) sont 2 paralogues, que l'on nommera par la suite DDX5/17, qui font partie de la famille des hélicases à domaine DEAD. Ces hélicases possèdent un domaine de fixation à l'ARN et un domaine de liaison et d'hydrolyse de l'ATP très conservés. Ces hélicases sont capables de dérouler localement les structures secondaires de l'ARN et sont dépendantes de l'hydrolyse de l'ATP pour cette activité. Les protéines DDX5 et DDX17 partagent 90% d'homologie au niveau du domaine hélicase. Les extrémités N-terminales et C-terminales sont plus divergentes (**Figure 34**). Outre p72, une forme p82 de 79 acides-aminés de DDX17 est fréquemment observée et résulte d'un événement de traduction alternative. Outre le fait qu'elle exhibe une activité hélicase semblable à celle décrite pour p72, ses fonctions restent mal connues. Ces hélicases DDX5/17 sont multifonctionnelles : elles ont été impliquées dans presque toutes les étapes de régulation des gènes, et plus particulièrement dans le métabolisme de l'ARN. Elles ont été récemment impliquées dans la régulation de la transcription et de l'épissage ainsi que dans le couplage entre la transcription et l'épissage (**Figure 34**).



**Figure 34 : Les hélicases à ARN DDX5/17 sont des facteurs qui régulent le couplage transcription-épissage**

### *a) DDX5/17 : couplage transcription et épissage alternatif*

DDX5 et DDX17 coordonnent de manière dynamique la transcription, l'épissage et la dégradation des ARNs lors de la myogénèse et de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) (Dardenne et al., 2014). Notre laboratoire a démontré que ces hélicases à ARN coopèrent avec le facteur d'épissage hnRNP H/F pour réguler l'épissage d'exons définis par un site 5'ss faible situé au sein de régions riches en GC pouvant former des G-quadruplex. Le complexe DDX5/17 et hnRNP H/F permet ainsi l'établissement d'un profil d'épissage spécifique des cellules non différenciées. Au cours de la myogénèse et l'EMT, DDX5/17 favorise l'expression de microARNs (miR-1, miR-206 et miR-182b) spécifiques (EMT ou myogénèse) qui vont à leur tour inhiber l'expression de ces hélicases et ainsi moduler le profil d'épissage (Dardenne et al., 2014). Par ailleurs, en accord avec d'autres données de la littérature (Caretto et al., 2006a; Warner et al., 2004), cette étude

montre que DDX5 et/ou DDX17 sont des co-activateurs transcriptionnels de facteurs de transcription majeurs tels que SMAD (EMT) et MyoD (myogénèse) (Dardenne et al., 2014).

### *b) Les hélicases à ARN DDX5/17 : des cofacteurs transcriptionnels*

Les hélicases à ARN DDX5 et DDX17 régulent la transcription par leurs interactions directes avec plusieurs facteurs de transcription (**Table 2**). La présence de DDX5 ou de DDX17 dans les complexes de facteurs de transcription module leur activité au niveau des promoteurs. Elles ont été également identifiées dans le complexe d'initiation de la transcription via notamment leur interaction avec l'ARN polymérase II et les protéines de remodelage de la chromatine telles que CBP, p300 ou PCAF (Rossow and Janknecht, 2003; Shin et al., 2007). Elles peuvent également réprimer la transcription des gènes via leur interaction avec les histones désacétylases HDAC1, 2 et 3 (Mooney et al., 2010; Wilson et al., 2004). Elles ont été également impliquées dans la répression des gènes cibles du facteur de transcription REST ; en effet DDX17 est nécessaire à la liaison à la chromatine de EHMT2 (méthyl-transférase qui catalyse la mono- et di-méthylation de l'histone H3 en lysine 9 (marque répressive de la Transcription)) au niveau de gènes régulés par REST (Lambert et al., 2018) (**Table 2**).

Les hélicases à ARN à domaine DEAD	Les partenaires			Références	
	Facteurs de transcription	Facteurs chromatinien	ARN non codants		
DDX5/ p68	VDR			(Fuller-Pace, 2013)	
	NF-κB/p50			(Wang et al., 2012)	
	Notch1		SRA	(Jung et al., 2013)	
	STAT3			(Sarkar et al., 2017)	
	E2F1			(Mazurek et al., 2012)	
	β-caténine		mrhl	(Arun et al., 2012)	
	RUNX2		PRC2	SRA	(Jensen et al., 2008)
			CTCF/Cohésine	SRA	(Yao et al., 2010)
		LOC284445	(Das et al., 2018)		
DDX17/ p72 et p82	SOX2			(Alqahtani et al., 2016)	
	REST	EHMT2		(Lambert et al., 2018)	
			MeXis	(Sallam et al., 2018)	
DDX5/ DDX17	ERα	CBP, p300	SRA	(Fuller-Pace, 2013)	
	AR				
	SMADs	CBP		(Dardenne et al., 2014; Warner et al., 2004; Yang et al., 2007)	
	MyoD	BRG1, p300	SRA	(Carette et al., 2006b; Dardenne et al., 2014)	
		HDAC1		(Jacobs et al., 2007; Jensen et al., 2008; Mooney et al., 2010)	
	NFAT5			(Germann et al., 2012)	

Table 2 : Les partenaires des hélicases à ARN DDX5/DDX17

### *c) DDX5/17 régule la transcription des gènes en interagissant avec les lncRNA*

Les longs ARN non codants (lncRNA) sont des acteurs importants de la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes supérieurs à travers différents mécanismes. Les lncRNA sont des transcrits de plus de 200 nucléotides qui ne comportent pas de cadre de lecture pour la production de protéines. Ils sont transcrits par l'ARNPII et ils régulent l'expression des gènes en se liant à différents facteurs protéiques et/ou directement à l'ADN. Les hélicases à ARN DDX5/17 interagissent avec les lncRNA, tels que SRA (DDX5/17) et Mrhl (DDX5), pour moduler l'expression génique (Arun et al., 2012; Caretti et al., 2006a; Dardenne et al., 2014)(Giraud et al., 2018). La régulation par DDX5/17 de l'activité du lncRNA SRA implique la fixation du complexe trithorax (TrxG) et du complexe polycomb 2 (PRC2). DDX5 et DDX17 améliorent l'interaction entre SRA et TrxG augmentant ainsi le taux H3K4me3. Par ailleurs, il a été montré que DDX5 stabilise la sous-unité SUZ12 de PRC2 qui favorise la répression des gènes médiée par PRC2 (Zhang et al., 2016). Cette régulation est dépendante du domaine de liaison à l'ARN de DDX5 (Zhang et al., 2016).

### *d) Rôle des hélicases à ARN DDX5/17 dans la régulation de l'épissage alternatif*

Les protéines DDX5/17 ont été impliquées dans le contrôle de l'épissage alternatif d'une multitude de transcrits dans divers contextes cellulaires via notamment leur activité hélicase (Clark et al., 2008; Dardenne et al., 2014; Germann et al., 2012; Samaan et al., 2014). Notamment, elles facilitent la dissociation de U1snRNP et le recrutement du tri-snRNP (U4, U6/U7) ; (Lin et al., 2005b). Plus particulièrement, ces hélicases à ARN détectent et ouvrent des structures secondaires en tige-boucle qui peuvent masquer des séquences de régulation de l'épissage, tel que démontré pour les gènes *CD44*, *H-ras* et *Tau* (Camats et al., 2008; Hönig et al., 2002a; Kar et al., 2011). L'action de DDX17 au niveau d'une tige-boucle qui masque le site 5' en aval de l'exon v4 du transcrit *CD44* permet le déroulement de l'ARN, l'exposition du site 5'ss, et l'inclusion de cet exon (Hönig et al., 2002b) (**Figure 35**).

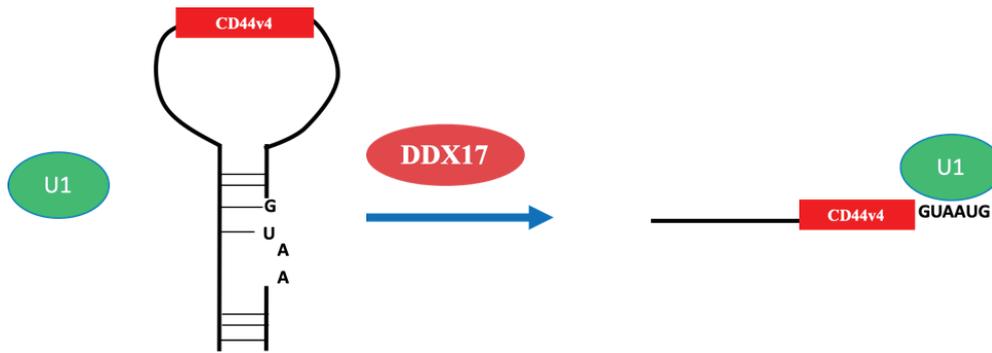


Figure 35 : Exemple de régulation de l'inclusion de l'exon CD44v4

### *e) Les hélicases à ARN DDX5/17 régulent la maturation des miRNA*

DDX5/17 participe également à la maturation des micro-ARN (miRNA) (Cramer et al., 1997; Gregory et al., 2004; Lambert et al., 2018; Li et al., 2018). DDX5 favorise l'interaction de protéines SMADs avec Drosha permettant ainsi l'expression et la maturation de microARNs en réponse aux facteurs de croissance TGF $\beta$  et BMP (Davis et al., 2010). De manière similaire, p53 s'associe à Drosha via DDX5 et permet l'expression des miR-16-1 et miR-143 (Suzuki et al., 2009).

### *f) DDX5/17 et Nonsense-Mediated Decay (NMD)*

Chez l'homme, il a été montré que DDX5 et DDX17 interagissent physiquement avec UPF3, un composant essentiel de la machinerie NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay). La déplétion de DDX5 favorise l'accumulation de transcrits contenant de long 3' UTR, tels que les transcrits DDX17 et SMG5. Or, SMG5 est un composant de la machinerie NMD. Ces données suggèrent une boucle de rétrocontrôle positif des niveaux d'expression de DDX5 et DDX17 (Geißler et al., 2013; Hug et al., 2016). L'impact de DDX5 sur le NMD est indépendante de son activité hélicase (Geißler et al., 2013).

## *g) DDX5/17 et l'export nucléaire*

DDX5 et DDX17 possèdent des séquences NLS et NES leur permettant de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Wang and Cambi, 2009). Zonta *et al.*, ont montré que DDX5 favorise l'export de l'ARN c-fos en recrutant les facteurs d'export Aly et TAP (Zonta et al., 2013).

## **C. Les mécanismes de couplage transcription et épissage alternatif**

Pour les gènes codant les protéines, l'épissage s'opère principalement de façon co-transcriptionnelle (Bentley, 2014). Bien que nous sachions depuis 1988 que la réaction d'épissage se produit simultanément avec la transcription, l'étude de ce phénomène a été abordée plus tard notamment grâce au développement des techniques de séquençage à haut débit (Anvar et al., 2018; Nojima et al., 2018).

### **1. Le modèle de recrutement**

Les travaux d'A.R. Kornblihtt ont mis en évidence que la structure de la région promotrice influence la sélection du site d'épissage (Cramer et al., 1997, 1999). L'étude de l'inclusion de l'exon EDI de la fibronectine a permis de montrer que l'utilisation du promoteur de la  $\beta$ -globuline en place du promoteur CMV induit une baisse de l'inclusion de cet exon (Cramer et al., 1997). La régulation de l'exon EDI serait régulée par un recrutement différentiel de protéines SR, ASF/SF2 et 9G8 au niveau de l'exon alternatif en fonction du promoteur utilisé (Cramer et al., 1999).

Le modèle de recrutement repose sur la capacité du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (RNAPII) à recruter des facteurs de transcription et/ou d'épissage. Le CTD de la RNAPII formerait une plateforme de recrutement qui influencerait les décisions d'épissage. Des

expériences de chromatographies d'affinité ont mis en évidence que le CTD de la RNAPII interagit avec les protéines SR, U2AF et Prp40 (Hsin and Manley, 2012).

Dans les cellules humaines, le CTD de la RNAPII est constitué de 52 répétitions de l'heptapeptide consensus Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (YSPTSPS) qui sont sujets à des modifications post-traductionnelles (PTM). Notamment, les sérines 2 et 5 (Ser2 et Ser5) ont été identifiées comme des sites majeurs de phosphorylation qui régulent l'activité transcriptionnelle de la RNAPII. Ainsi, le modèle actuel est que pour la grande majorité des gènes codant, l'ARNPII est recrutée sous sa forme hypo-phosphorylée, puis elle est phosphorylée sur la Ser5 lors de l'initiation de la transcription, et enfin phosphorylée sur la Ser2 lors de l'élongation. Cette phosphorylation différentielle de la Ser2 vs Ser5 régule le recrutement des protéines associées à la transcription à la phase appropriée du cycle de transcription. Le CTD de la ARNPII non phosphorylé interagit avec le complexe du médiateur, la phosphorylation par TFIIH (CDK7) de la Ser5 et Ser7 induit une perte d'affinité du CTD pour le médiateur permettant ainsi l'échappement de l'ARNPII du promoteur et l'initiation de la transcription. Ensuite la phosphorylation en Ser2 facilite le recrutement de PAF1 complexe (RNA polymerase II-associated factor 1) et des facteurs de transcription tel que SPT6 permettant l'élongation de la transcription. Il a été décrit que l'utilisation d'un mutant de ARNPII sans CTD induit l'inclusion de l'exon EDI (exon 33) du gène codant pour la fibronectine. Ce résultat constitue l'une des premières évidences de l'implication du domaine CTD dans la régulation de l'épissage. Il a été montré que ce mutant n'est plus capable de recruter le facteur d'épissage SRSF3 (serine/arginine-rich splicing factor 3) au niveau de l'exon EDI et d'induire son exclusion des transcrits naissants (**Figure 36**) (de la Mata and Kornblihtt, 2006).

## Modèle recrutement

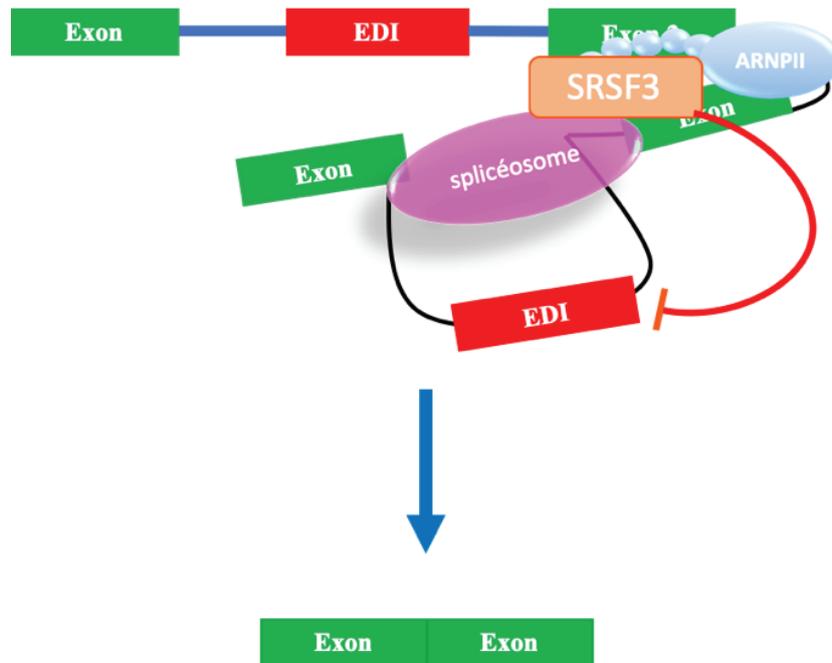


Figure 36 : Inhibition de l'inclusion de l'exon EDI par le recrutement de SRSF3 au niveau du domaine CTD de ARN polymérase II

## 2. Le modèle de cinétique

Le modèle de cinétique repose sur la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II et son impact sur les décisions d'épissage alternatif. En effet, l'utilisation de séquences réduisant la vitesse d'élongation ainsi que des drogues inhibitrices (DRB, la camptothécine et  $\alpha$  amanitine) ou activatrices (inhibiteur de déacétylases d'histones, trichostatin A (ou TSA)) de l'élongation de la transcription, impactent la régulation de l'épissage alternatif. L'évidence du rôle de la vitesse d'élongation de l'ARNPII a été apportée via l'utilisation d'un mutant du CTD (C4) qui engendre une diminution de 2 fois de la vitesse d'élongation de la ARNPII *in vitro et in vivo* (Boireau et al., 2007; Coulter and Greenleaf). Dans ces conditions, il a été observé une augmentation de l'inclusion de l'exon EDI du gène codant la fibronectine (de la Mata et al., 2003). Selon ce modèle de cinétique, il est proposé que lors d'une vitesse élevée d'élongation transcriptionnelle le transcrit primaire expose plusieurs sites d'épissage (**Figure 37**) qui entrent alors en compétition pour le choix d'épissage. Les sites d'épissage faibles sont alors ignorés au profit des sites forts. En revanche, le ralentissement ou la pause de l'ARNPII (via la phosphorylation du CTD en Ser 5 par exemple) permet la reconnaissance et la sélection du site 3' d'épissage faible de l'exon EDI par le splicéosome et permet son inclusion. Une étude récente démontre que le splicéosome actif est associé à l'ARNPII phosphorylée en Ser5 (Nojima et al., 2018). La majorité des transcrits clivés au niveau du 5'ss détectés par NET-seq (ARNs longs et courts) sont déjà épissés en amont indiquant une épissage cotranscriptionnel séquentiel (Nojima et al., 2018). L'inhibition de la transcription via le DRB révèle qu'une majorité des exons alternatifs sont régulés selon le modèle cinétique.

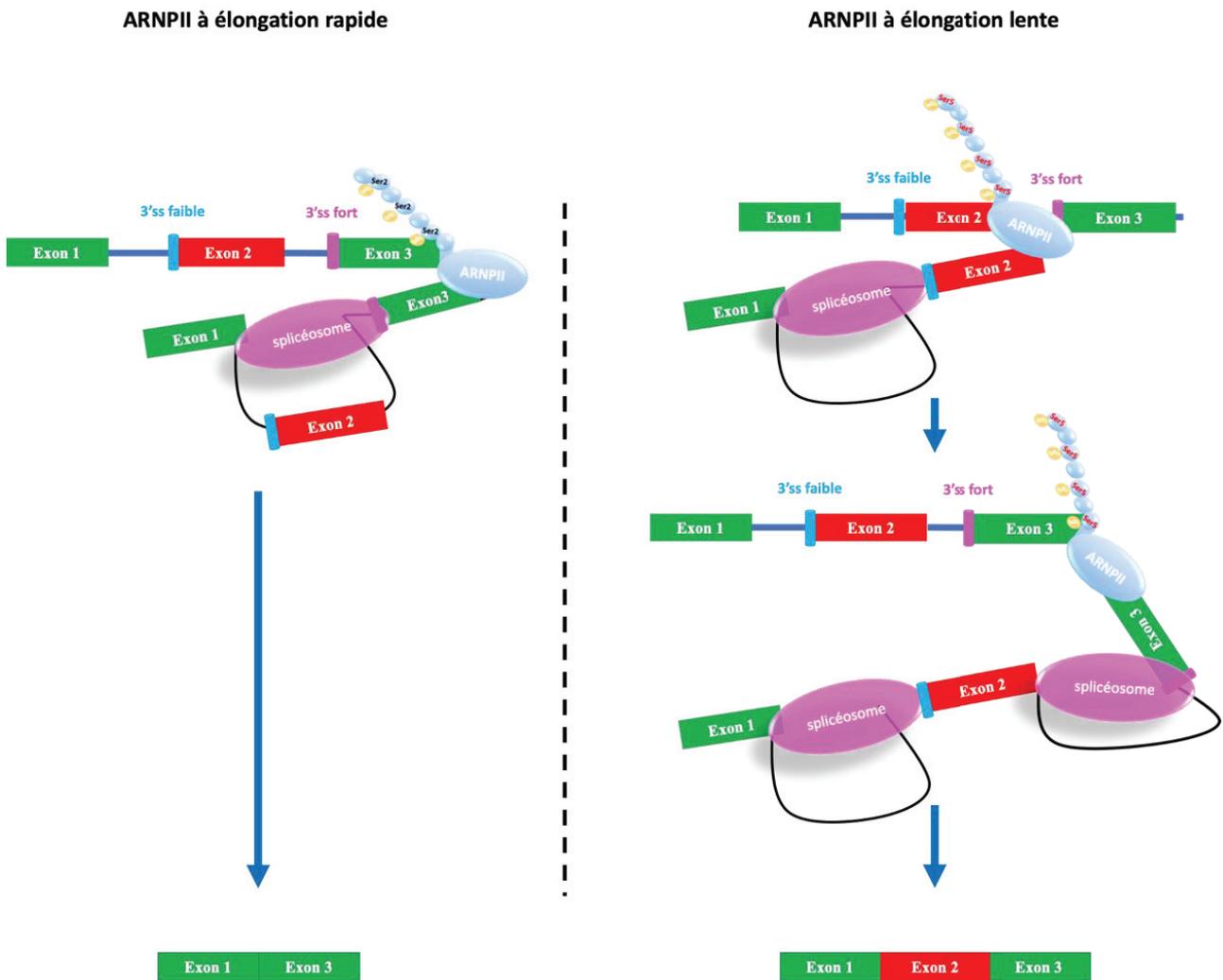


Figure 37 : Schéma du modèle cinétique

Une vitesse d'élongation rapide de l'ARNPII induit la reconnaissance des sites d'épissage forts au détriment des faibles entraînant une exclusion de l'exon faible (panel de gauche). A l'inverse, une vitesse réduite permet au splicéosome de reconnaître les deux exons (panel de droite).

Des études montrent également que des exons peuvent être régulés de manière opposée. Notamment, l'exclusion de l'exon 9 du gène CFTR est associée à un ralentissement de l'ARNPII (Dujardin et al., 2014). Cet exemple ne contredit pas forcément le modèle cinétique mais apporte un mécanisme complémentaire pour cette classe d'exons. Notamment, le ralentissement de l'élongation de la transcription favoriserait le recrutement du facteur inhibiteur d'épissage ETR-3 en 3' de l'intron 8 empêcherait la fixation de U2AF65 induisant l'exclusion de l'exon 9 du transcrit mature (Dujardin et al., 2014). Ces différentes études ne permettent pas d'exclure complètement l'hypothèse d'un effet indirect qui se traduirait par un recrutement différentiel de facteurs au niveau de ARNPII et/ou un impact sur le pool des facteurs d'épissage.

Cependant le lien entre la pause de ARNPII et l'assemblage du splicéosome est un mécanisme qui reste encore mal compris. Le développement de techniques de microscopie et de séquençage à l'échelle du nucléotide pourrait dans un futur proche permettre d'adresser plus précisément cette question.

### 3. Un rôle des facteurs de transcription dans la régulation de l'épissage alternatif

Un facteur de transcription est défini comme acteur protéique qui active ou inhibe le recrutement de l'ARN polymérase sur des promoteurs de gènes. Depuis quelques années, on voit l'émergence de données en faveur d'une implication de ces facteurs dans d'autres étapes de l'expression des gènes tels que la maturation de l'ARN, incluant notamment l'épissage alternatif. Par exemple, les facteurs de transcription oncogènes DEK et WT1 ont été décrits comme régulateurs de l'épissage des gènes impliqués dans le lignage hématopoïétique (Mohamed et al., 2012). Par exemple, la protéine DEK interagit avec les composants U2AF35 et U2AF65 du splicéosome. Sous sa forme phosphorylée en sérines 19 et 32, DEK se lie à U2AF35 et favorise ainsi sa la fixation au site 3' d'épissage (AG). En contrepartie, DEK empêche le recrutement de U2AF65 au niveau de polypyrimidine tract leurre (séquence riche en pyrimidine non fonctionnel empêchant l'assemblage et la réaction d'épissage à se mettre en place). Ce

mécanisme constitue une régulation supplémentaire pour la bonne détection des sites d'épissage par le spliceosome. En effet, la forme phosphorylée de DEK est nécessaire à l'élimination de l'intron mais ne participe pas à l'assemblage de la machinerie d'épissage (Soares et al., 2006).

Dans le but de mettre en évidence de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif, le groupe de Benjamin J. Blencowe a mis en place une nouvelle stratégie appelée SPAR-seq (Systematic Parallel Analysis of Endogenous RNA Regulation Coupled to Barcode Sequencing). L'analyse par SPAR-seq a permis de démontrer que les facteurs de transcription qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN (57% de facteurs à doigt zinc (Zf) dont 42% contenant un domaine C2H2) ont un impact similaire à celui des facteurs d'épissage dans les cellules NA2 (cellules de neuroblastome de souris) (Han et al., 2017). En effet, ces facteurs de transcription ont une incidence sur l'épissage alternatif à travers différents mécanismes. Un des mécanismes qui permet de faire un lien entre les facteurs de transcription et l'épissage est la capacité de ces facteurs à interagir avec l'ARN et à recruter les facteurs d'épissage au niveau des transcrits naissants (Han et al., 2017). Cette étude démontre également que certains facteurs de transcription se fixent sur des séquences régulatrices de l'épissage et régulent également l'expression des régulateurs d'épissage qui contrôlent les mêmes exons cibles. Par exemple, la déplétion de Zfp871 impacte l'épissage de gènes ciblés par le facteur d'épissage Srrm4, impliqué dans la différenciation neuronale. Zfp871 module l'épissage de façon indirecte car c'est son inhibition transcriptionnelle qui induit une réduction de l'expression d'environ 40% de Srrm4. L'analyse de CLIP-seq (Crosslinking and immunoprecipitation) (**Annexe, Figure 3**) permet de montrer une fixation préférentielle de Zfp871 au sein des séquences introniques enrichies en motif UGC qui correspond à une séquence de fixation de Srrm4 et proches de l'exon régulé. L'exon régulé par ce mécanisme est inclus dans l'ARN transcrit mature dans la majorité des cas. Le facteur de transcription Nacc1, quant à lui, régule l'expression des facteurs d'épissage Mbnl1 et Mbnl2, ce qui impacte de manière indirecte l'épissage des exons ciblés par ces deux facteurs. En parallèle, Nacc1 est capable de se fixer directement à l'ARN de ses gènes cibles, au niveau de l'exon régulé et de l'intron adjacent, et il est donc capable d'impacter aussi l'épissage de manière directe. Par ailleurs, Girardot et al., montrent un nouveau rôle du facteur de transcription SOX9 dans la

régulation de l'épissage alternatif. SOX9 se lie à l'ARN au niveau de l'exon régulé cependant la perte de ce recrutement dans la condition SOX9-A119V n'affecte pas la régulation de l'épissage d'un autre de ses gènes cibles, le mini-gène ZDHHC16. SOX9 se fixe au niveau du promoteur des gènes dont il régule également l'épissage cependant SOX9 régule l'épissage alternatif de ses gènes cibles de manière indépendante de son rôle transcriptionnel. Notamment l'établissement du mutant SOX9 W144R permet de découpler ses deux fonctions, ce mutant semble inhiber de manière significative la transcription uniquement, sans impacter la régulation de l'épissage alternatif des gènes cibles. Cette étude montre que SOX9 coopère avec de nombreuses protéines reliées au métabolisme des ARNs dont NONO, PSP1, Sam68 et les composants du complexe EJC (exon junction complex) : Y14, EIF4A3 et MAGOH. SOX9 module 60% des cibles du facteur Y14 (Girardot et al., 2018).

Ces observations suggèrent que la régulation du métabolisme des ARNs et plus particulièrement l'épissage par des facteurs de transcription n'est pas un phénomène isolé. De plus, pour la plupart, ils régulent l'épissage alternatif de leur gènes cibles en interagissant directement avec l'ARN ou de manière indirecte en affectant le pool de facteurs d'épissage nécessaires à leur régulation.

## D. Contrôle de l'épissage par la régulation de la chromatine

### 1. Le nucléosome : une barrière à l'élongation transcriptionnelle

La régulation de la vitesse de progression de la RNAPII est dépendante de la régulation de la conformation de la chromatine. *In vitro*, il a été démontré que la présence d'un nucléosome est suffisante pour ralentir ou stopper l'ARNPII (Hodges et al., 2009; Izban and Luse, 1991). De plus, il est bien établi que le positionnement des nucléosomes par rapport au TSS, aux sites de terminaison de la transcription (TS), aux exons et aux introns, aide à définir l'architecture des gènes. Il a été observé que l'enrichissement de l'ARNPII et de nucléosomes est présent essentiellement aux bornes des exons plutôt qu'aux introns flanquant (Chodavarapu et al., 2010). Il a été proposé par conséquent que la présence de nucléosomes constitue une barrière qui induirait le ralentissement ou une pause transitoire de l'ARNPII. Dans ce contexte, le complexe SWI/SNF et plus particulièrement la sous unité catalytique BRM ont été décrits en interaction avec des facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage U1 et U5 snRNP et le facteur d'épissage Sam68 (Batsché et al., 2006). L'inclusion des exons alternatifs de *CD44* coïncide avec une ARNPII en pause (phosphorylée en sérine 5) et le recrutement de BRM (Batsché et al., 2006). Ces données suggèrent que le complexe SWI/SNF régule l'épissage des exons variables du gène *CD44* via un ralentissement ou pause de l'ARN polymérase II.

## 2. Les modifications d'histones impactent la régulation de l'épissage

Les histones sont la cible de modifications post-traductionnelles : acétylation, méthylation, ubiquitinylation, sumoylation, et phosphorylation (Latham and Dent, 2007). Il a été proposé que ces modifications puissent faciliter la définition des exons en affectant le recrutement des facteurs d'épissage et modulant la vitesse d'élongation de l'ARNPII. Une chromatine accessible est associée à une élongation rapide de ARNPII alors qu'une chromatine compacte favoriserait un ralentissement ou une pause de la polymérase. Le gène *FGFR2* possède deux exons mutuellement exclusifs conduisant à production de deux variants d'épissage qui possèdent soit l'exon III-b (forme épithéliale) et soit l'exon III-c (forme mésenchymateuse). Dans les cellules mésenchymateuse hMSC, l'exon III-b est exclus, ceci est corrélé à un enrichissement de la marque H3K36me3 et un appauvrissement en H3K4me3 au niveau de la région des exons variables comprenant ces deux exons. Dans les cellules mésenchymateuses hMSC, il a été proposé que l'enrichissement de la marque H3K36me3 est associé au recrutement et à la fixation de la protéine adaptatrice MGR15 qui à son tour favoriserait le recrutement du facteur d'épissage PTB et l'exclusion de l'exon III-b.

Le tableau ci-dessous résume les principaux travaux menés pour comprendre les différents mécanismes qui relie la régulation de l'épissage et les modifications post traductionnelles des histones.

	Modifications Histones	Facteurs impliqués	Impact sur Épissage alternatif	Références
ACÉTYLATION	H3K9ac H3K14ac	GCN5/ U2 snRNP	Diminution de l'inclusion de l'exon 18 NCAM	(Gunderson and Johnson, 2009; Schor et al., 2009)
Méthylation	H3K4me3	CDH1/ U2 snRNP	Augmente l'efficacité de l'épissage	(Sims et al., 2007)
	H3K36me3	MRG15/ PTB  Psp1/SRSF1	Inhibition de l'inclusion des exons cibles de PTB  Régule les exons cibles de SRSF1	(Luco et al., 2010)  (Pradeepa et al., 2012)
	H3K9me3	HP1γ/ U2 snRNP /U2AF65/Prp8	Inclusion du CD44v6	(Saint-André et al., 2011)
	H3K9me2 H3K27me3		Inhibition d'élongation et l'inclusion d'exon EDI	(Schor et al., 2013)
Ubiquitinylation	H2Bu	USP49/U1/U2	Diminution de l'efficacité d'excision de l'intron 2 de SLMO2	(Zhang et al., 2013)
Variant d'histone	H2A. Bdb	SFR3B	Déplétion de ce variant d'histone est corrélé à une augmentation de séquences contenant les jonctions introns-exons H2A. Bdb serait impliqué dans la formation d'une structure chromatinienne qui faciliterait l'épissage	(Tolstorukov et al., 2012)

Table 3 : Rôle des histones et des modifications post-traductionnelles des histones dans la régulation de l'épissage

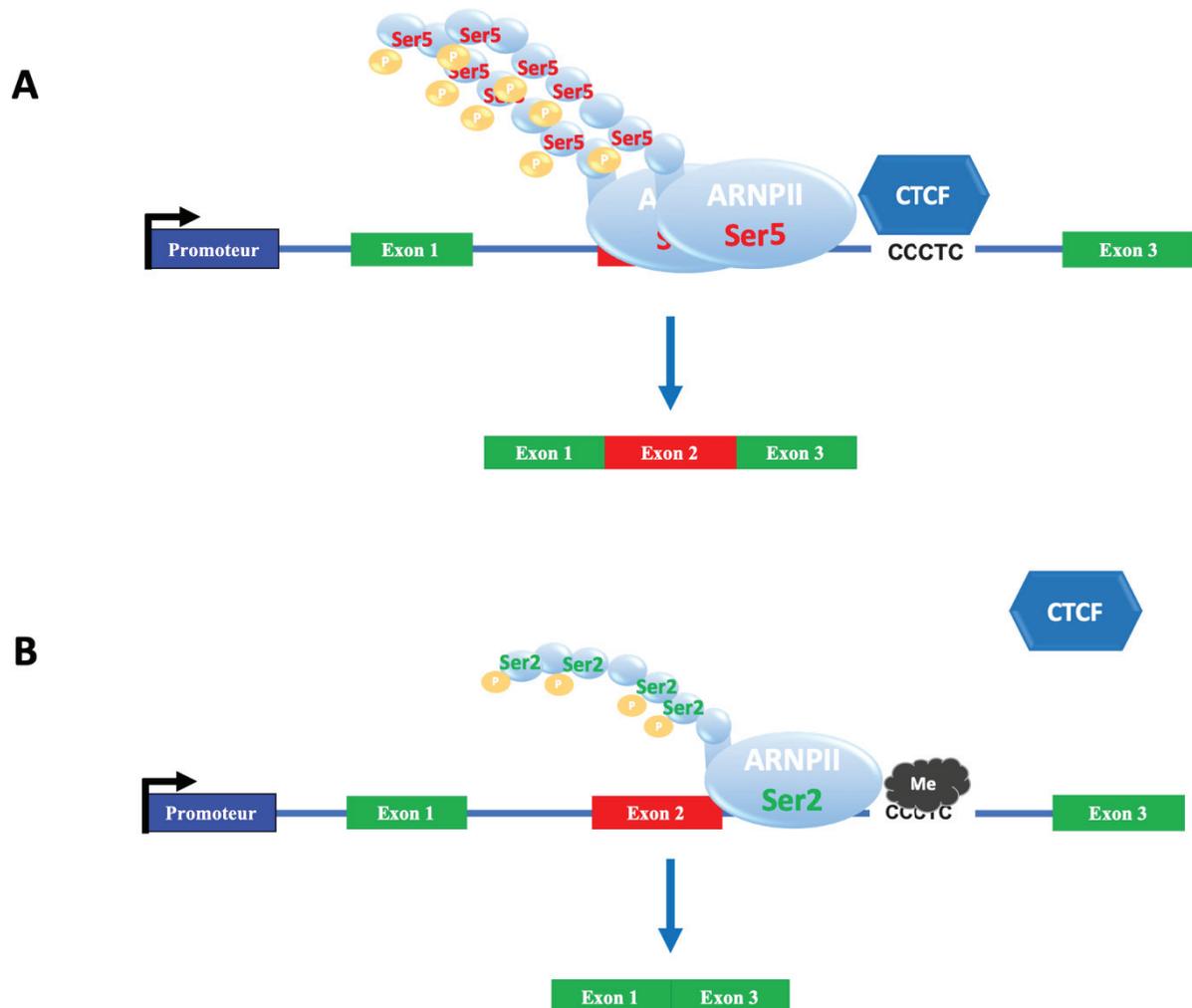
### 3. L'état chromatinien et les ARNs non codants

La chromatine est très souvent au contact de petits ARN non codants (ncRNA). La présence de ncRNA aux régions introniques et exoniques peut favoriser l'inclusion d'exons en influençant un enrichissement local d'H3K9me2ty et H3K27me3 (marques répressives de la transcription) (Han et al., 2007; Weinberg et al., 2006). Ces ncRNA peuvent être complexés aux protéines argonautes AGO1 et AGO2. Ces protéines s'associent avec les petits ARN interférents et permettent la répression transcriptionnelle des gènes cibles. La déplétion de ces facteurs prévient l'hétéro-chromatinisation locale et l'inclusion de l'exon. Par ailleurs, il a été montré que AGO1 et AGO2 interagissent avec la chromatine mais aussi avec des composants du spliceosome et des facteurs d'épissage (Ameyar-Zazoua et al., 2012). Les longs ncRNA (lncRNA) ont été également impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Plus particulièrement, le lncRNA anti-sens codé par le gène *FGRF2* est exprimé lors de l'inclusion de l'exon III-b. Cet anti-sens régule l'environnement chromatinien via notamment le complexe PRC2 et KDM2a. Cette hétéro-chromatinisation empêche la fixation de facteurs d'épissage inhibiteurs et maintient l'inclusion de l'exon III-b (Gonzalez et al., 2015).

### 4. La méthylation de l'ADN module l'épissage alternatif

Outre la chromatine, les modifications épigénétiques de l'ADN, telle que la méthylation, contribuent également à la régulation de l'épissage alternatif. L'équipe de Gil Ast a récemment démontré que les niveaux de méthylation de l'ADN sont plus élevés dans les régions génomiques codant pour des exons que dans les séquences introniques flanquantes, suggérant un rôle de la méthylation dans la régulation de l'épissage (Gelfman et al., 2013). La méthylation de l'ADN interfère avec l'élongation de l'ARNPII, notamment via CTCF et la protéine MeCP2, et facilite l'inclusion des exons faibles (Marina et al., 2016; Shukla et al., 2011; Young et al., 2005). Le deuxième mécanisme est la mise en place d'une plateforme de recrutement par l'intermédiaire des protéines HP1 (Maunakea et al., 2013; Shukla et al., 2011; Yearim et al., 2015). Ces protéines affectent la décision d'épissage en fonction de la méthylation en recrutant les facteurs d'épissage tel que U2snRNP. En effet, il a été montré que la fixation de CTCF à l'exon 5 du gène *CD45* induit un ralentissement de l'ARNPII favorisant ainsi l'inclusion de cet

exon (Shukla et al., 2011). La méthylation du site de fixation de CTCF prévient sa liaison à l'ADN et entraîne l'exclusion de l'exon 5. L'analyse large échelle des sites de fixation de CTCF révèle que les exons alternatifs possédant des sites de liaison au CTCF en aval sont associés à une inclusion de l'exon alternatif dans les cellules BL41 et BJAB en présence de CTCF (**Figure 38**).



**Figure 38 : Rôle de CTCF et la méthylation sur la régulation de l'épissage alternatif**

A. En l'absence de méthylation, CTCF se fixe au niveau de son site consensus. Il crée ainsi un obstacle à l'élongation de l'ARNPII ce qui favorise la reconnaissance de l'exon en amont et son inclusion. B. La méthylation du site de reconnaissance de CTCF en amont de l'exon alternatif empêche son recrutement, ceci est associé à une élongation rapide de l'ARNPII conduisant ainsi à l'exclusion de l'exon.

Pour étudier le lien *in vivo* entre la méthylation de l'ADN et la régulation de l'épissage alternatif, le laboratoire de Gil Ast a mis en place une stratégie CRISPR/dCas9 (Cas9 dépourvue d'activité endonucléase) qui permet le ciblage spécifique à l'ADN dans des régions exoniques ou introniques par les méthyl-transférases DNMT3A et DNMT3L ou la méthylase TET1. Cette approche a permis de montrer un lien de causalité entre la méthylation de l'ADN de l'exon et son niveau d'exclusion dans l'ARN. Aucun effet n'a pu être mis en évidence en ce qui concerne la méthylation des séquences introniques. Cette étude constitue la première preuve directe que la méthylation des exons est impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif (Shayevitch et al., 2018).

## 5. Organisation tridimensionnelle de la chromatine et régulation de l'épissage alternatif

Les données de séquençage CHIP-seq CTCF, RNA-seq ainsi que les données Hi-C ont permis de mettre en évidence, une corrélation entre la formation de boucles chromatiniennes médiées par CTCF entre les promoteurs, les régions intragéniques (régions contenant les exons alternatifs) et l'inclusion de ces exons dans l'ARNm (Ruiz-Velasco et al., 2017). Mercer et al. ont montré que les exons se situent au niveau de régions ouvertes de la chromatine ou sites d'hypersensibilité à la DNase (DHS) (Mercer et al., 2013). Ces exons DHS proches des promoteurs sont enrichis en composants liés à la transcription (ARNPII, facteurs de transcription) et en marques d'histones présentes au niveau des promoteurs (H3K4 me3, H3K4 me2, H3K9ac et H3K27ac) et ils sont également proches de sites de liaison de CTCF et Cohésine, des protéines connues pour être impliquées dans l'organisation 3D de la chromatine. Ils ne sont pas pour autant des promoteurs actifs, en effet l'analyse de CHIP-seq natif (sans crosslink) d'H3K4me3 a révélé une diminution de l'enrichissement de cette marque au niveau de ces exon DHS. Cet argument est en faveur de contacts physiques entre le promoteur et ces exons. De plus, un enrichissement des exons DHS a été observé dans les régions génomiques impliquées dans les interactions chromatine à longue distance où le complexe de pré-initiation de l'ARNPII est présent (Mercer et al., 2013). Les interactions entre les exons DHS et les promoteurs ont été décrites comme étant spécifiques du type cellulaire (Mercer et al., 2013). L'enrichissement

de facteurs de transcription comme p300 et des marques d'histones telles que H3K4me1 et H3K4me3 peut également être dû à l'interaction avec des enhancers transcriptionnels. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que la sous-unité MED23 du complexe médiateur (complexe qui module de manière positive ou négative la transcription des gènes) participe également à la régulation de l'épissage alternatif par l'intermédiaire de son interaction avec le facteur d'épissage alternatif hnRNPL *in vivo* (Ernst et al., 2011; Kagey et al., 2010).

Par ailleurs, il a été décrit qu'environ 80% de l'enrichissement de AGO1 au niveau de la chromatine est associé à des enhancers transcriptionnels spécifiques à un type cellulaire. Ce recrutement préférentiel d'AGO1 au niveau des enhancers intragéniques est médié par des lncRNA. Les analyses par CHIP-seq et RNA-seq révèlent que le recrutement AGO1 est associé à des événements d'épissage alternatif.

Enfin, l'analyse intégrative par Hi-C, RNA-seq et ATAC-seq dans les cellules cardiaques révèle l'existence d'usine à transcription enrichie en RBM20, un facteur d'épissage. Plus précisément, une de ces factory favorise le regroupement inter-chromosomique des gènes *TTN*, *CACNA1C* et *CAMK2D*, ceci est associé à une co-régulation transcriptionnelle de ces gènes. Elle semble former également des usines d'épissage spécialisées et enrichies en RBM20 favorisant ainsi la co-régulation de l'épissage de ces transcrits (Bertero et al., 2019).

En conclusion, l'interconnexion entre la chromatine et l'épissage alternatif est complexe. En effet, le contexte chromatinien est en mesure d'impacter à la fois le recrutement des facteurs de l'épissage et la vitesse d'élongation de l'ARNPII et ainsi de moduler l'épissage alternatif de l'ARN en cours de synthèse. Cependant il reste difficile d'établir une règle générale car le contexte chromatinien est spécifique du contexte cellulaire étudié. Une même marque d'histone sur un gène peut avoir des effets divers sur la décision d'épissage selon le type cellulaire étudié (Saint-André et al., 2011; Smallwood et al., 2012). Par exemple, la déplétion de HP1 $\gamma$  (régulateur de H3K9me3) n'affecte pas l'épissage du gène *CD44* dans les cellules HCT116 contrairement à ce qui a pu être observé dans les cellules HeLa (Saint-André et al., 2011; Smallwood et al., 2012).

# Résultats

## Problématique et résultats du travail de thèse

Les effets de l'oncoprotéine Tax sur la transcription des gènes de la cellule hôte ont longtemps été au centre des recherches menées sur les mécanismes leucémogènes liés à HTLV-1. Ils font intervenir des facteurs de transcription et des régulateurs de la chromatine qui, via Tax, reprogramment l'activité de promoteurs de gènes et l'élongation transcriptionnelle. L'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par Tax joue tout particulièrement un rôle majeur dans l'initiation et la promotion tumorale. Plus récemment, une étude au laboratoire a mis en évidence que, outre des modifications quantitatives de l'expression des gènes, les cellules infectées *in vivo* subissent des remaniements qualitatifs des transcrits, incluant des modifications de l'épissage alternatif qui culminent au stade de l'ATL (Thénoz et al., 2014). Il est bien établi aujourd'hui que les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif sont étroitement couplés à la transcription, néanmoins les rôles de Tax et de NF- $\kappa$ B dans ces étapes de contrôle de la diversité des transcrits restent inconnus.

Nos travaux montrent ici que Tax perturbe l'épissage d'un grand nombre de transcrits indépendamment de ses activités sur la transcription. Les gènes modifiés en épissage sont engagés dans des voies fonctionnelles distinctes de celles contrôlées par les gènes régulés sur le plan quantitatif. Néanmoins, les conséquences fonctionnelles des modifications d'épissage liées à Tax peuvent contribuer à modifier le phénotype des cellules et participer à leur transformation maligne. Certaines modifications d'épissage reliées à Tax sont retrouvées dans les cellules d'ATL. De façon intéressante, l'expression des gènes codant les facteurs d'épissage n'est pas modifiée par Tax mais nous mettons en évidence que l'oncoprotéine virale peut interagir physiquement avec le facteur d'épissage DDX17, une hélicase à ARN impliquée dans le couplage transcription/épissage. Nos résultats montrent que cette interaction est dépendante de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Sur la base des travaux mettant en évidence la capacité de la sous-unité RelA à se fixer au niveau des régions intragéniques, incluant des exons et des introns, nous avons recherché si la formation du complexe RelA:DDX17 pouvait prendre place à la chromatine à proximité d'exons alternatifs. Les analyses des données de CHIP-seq montrent que la fixation intragénique de RelA est plus fréquemment retrouvée à proximité d'exons alternatifs que d'exons constitutifs. L'analyse intégrative des données de CHIP-seq et

de RNA-seq montrent que les exons régulés par Tax, et comportant un site de fixation de RelA à proximité (< 1kb), portent des sites d'épissage faibles dont la composition nucléotidique est riche en GC. Ces caractéristiques sont partagées par les exons régulés par l'hélicase DDX17. Ces données suggèrent que RelA et DDX17 peuvent réguler l'épissage alternatif des mêmes exons. Cette hypothèse a pu être vérifiée par des essais de CHIP quantitatifs qui démontrent que, sous l'expression de Tax, les modifications d'épissage des transcrits des gènes *CD44*, *SEC31B*, *CASK* et *MYCBP2* s'accompagnent d'un enrichissement en RelA et en DDX17 à la chromatine à proximité de l'exon régulé. Les relations causales du recrutement à la chromatine du complexe RelA :DDX17 sur l'épissage ont été obtenues par des essais de TALE qui montrent que c'est la fixation intragénique de RelA qui permet le recrutement de DDX17 à la chromatine et la régulation de l'inclusion de l'exon dans les transcrits de façon dépendante à l'activité hélicase à ARN de DDX17. Ces données démontrent pour la première fois l'implication physique de NF- $\kappa$ B dans la régulation de l'épissage alternatif, et revisite nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la pathogénèse liée à HTLV-1.

Ce travail est actuellement en révision à *Nature Communications*. L'article et les figures/tables supplémentaires sont disponibles sur le site de BioRxiv à l'adresse :

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/676353v1>

**Intragenic recruitment of NF- $\kappa$ B drives alternative splicing modifications upon activation by the viral oncogene TAX of HTLV-1.**

Lamya Ben Ameer<sup>1</sup>, Morgan Thenoz<sup>1,2,§</sup>, Guillaume Giraud<sup>1, §</sup>, Emmanuel Combe<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Claude<sup>1</sup>, Sebastien Lemaire<sup>1</sup>, Nicolas Fontrodona<sup>1</sup>, H  l  ne Polveche<sup>3</sup>, Marine Bastien<sup>1,4</sup>, Antoine Gessain<sup>5</sup>, Eric Wattel<sup>6</sup>, Cyril F. Bourgeois<sup>1</sup>, Didier Auboeuf<sup>1,\*</sup> and Franck Mortreux<sup>1,\*</sup>.

1. Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, 46 All  e d'Italie Site Jacques Monod, F-69007, Lyon, France

2. Faculty of Medicine and Health Sciences Department of Pediatrics and medical genetics, 9000 Gent, Belgium

3. CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes, 91100, France

4. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, United Kingdom

5. Unit   d'  pid  miologie et Physiopathologie des Virus Oncog  nes, Institut Pasteur, Paris, France.

6. Universit   Lyon 1, CNRS UMR5239, Oncovirologie et Bioth  rapies, Facult   de M  decine Lyon Sud, ENS - HCL, Pierre B  nite, France; Universit   Lyon I, Service d'H  matologie, Pavillon Marcel B  rard, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre B  nite, France.

§ These authors contributed equally

\* corresponding authors

## Summary

The chronic NF- $\kappa$ B activation in inflammation and cancer has long been linked to persistent activation of NF- $\kappa$ B responsive gene promoters. However, NF- $\kappa$ B factors such as RelA also massively bind to gene bodies. Here, we demonstrate that the recruitment of RelA to intragenic regions regulates alternative splicing upon activation of NF- $\kappa$ B by the viral oncogene TAX of HTLV-1. Integrative analysis of RNA splicing and chromatin occupancy, combined with chromatin tethering assays, demonstrate that DNA-bound RelA interacts with and recruits the splicing regulator DDX17 in a NF- $\kappa$ B activation-dependent manner, leading to alternative splicing of target exons thanks to DDX17 RNA helicase activity. This NF- $\kappa$ B/DDX17 axis accounts for a major part of the TAX-induced alternative splicing landscape that mainly affects genes involved in oncogenic pathways. Collectively, our results demonstrate a physical and direct involvement of NF- $\kappa$ B in alternative splicing regulation, which significantly revisits our knowledge of HTLV-1 pathogenesis and other NF- $\kappa$ B-related diseases.

Keywords : NF- $\kappa$ B, alternative splicing, HTLV-1, viral oncogenesis.

## Introduction

The Human T-cell leukemia virus (HTLV-1) is the etiologic agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) <sup>1</sup>, an aggressive CD4+ T-cell malignancy, and of various inflammatory diseases including the HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) <sup>2</sup>. It has long been established that changes in gene expression level participate to the persistent clonal expansion of HTLV-infected CD4+ and CD8+ T-cells, leading ultimately to HTLV-1 associated diseases <sup>3</sup>. We recently reported that alternative splicing events help to discriminate between ATLL cells, untransformed infected cells and their uninfected counterparts derived from patients <sup>4</sup>. Alternative splicing of pre-messenger RNAs is a cotranscriptional processing step that controls both the transcriptome and proteome diversity and governs in turn cell fate. Its regulation relies on a complex and still incompletely understood interplay between splicing factors, chromatin regulators and transcription factors <sup>5,6</sup>. In this setting, the molecular mechanisms of HTLV-1-induced splicing modifications and whether these effects rely on an interplay between transcription and splicing is not known.

TAX is an HTLV-1-encoded protein that regulates viral and cellular gene transcription. TAX also alters host signaling pathways that sustain cell proliferation and lead ultimately to cell immortalization <sup>7</sup>. The Nuclear factors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway is the most critical target of TAX for cell transformation <sup>8</sup>. The NF- $\kappa$ B transcription factors (RelA, p50, c-Rel, RelB, and p52) govern immune functions, cell differentiation and proliferation <sup>9</sup>. NF- $\kappa$ B activation involves the degradation of I $\kappa$ B that sequesters NF- $\kappa$ B factors in the cytoplasmic compartment, leading to NF- $\kappa$ B nuclear translocation and binding of NF- $\kappa$ B dimers (e.g., RelA:p50 for the most abundant) to their target promoters <sup>10,11</sup>. TAX induces IKK phosphorylation and I $\kappa$ B degradation, leading to persistent nuclear translocation of NF- $\kappa$ B <sup>12,13</sup>. In addition, TAX interacts with nuclear NF- $\kappa$ B factors and enhances their effects on transcription <sup>14,15</sup>.

Interestingly, genome-wide analyses of NF- $\kappa$ B distribution have unveiled that the vast majority of RelA peaks is outside promoter regions and can be localized in introns and exons <sup>16-19</sup>. Some of those promoter-distant RelA binding sites correspond to *cis*-regulatory transcriptional elements <sup>20,21</sup> but globally, there is a weak correlation between the binding of

RelA to genes and regulation of their steady-state expression<sup>17,18</sup>. These data suggest that NF- $\kappa$ B could have other functions than its initially described transcription factor function.

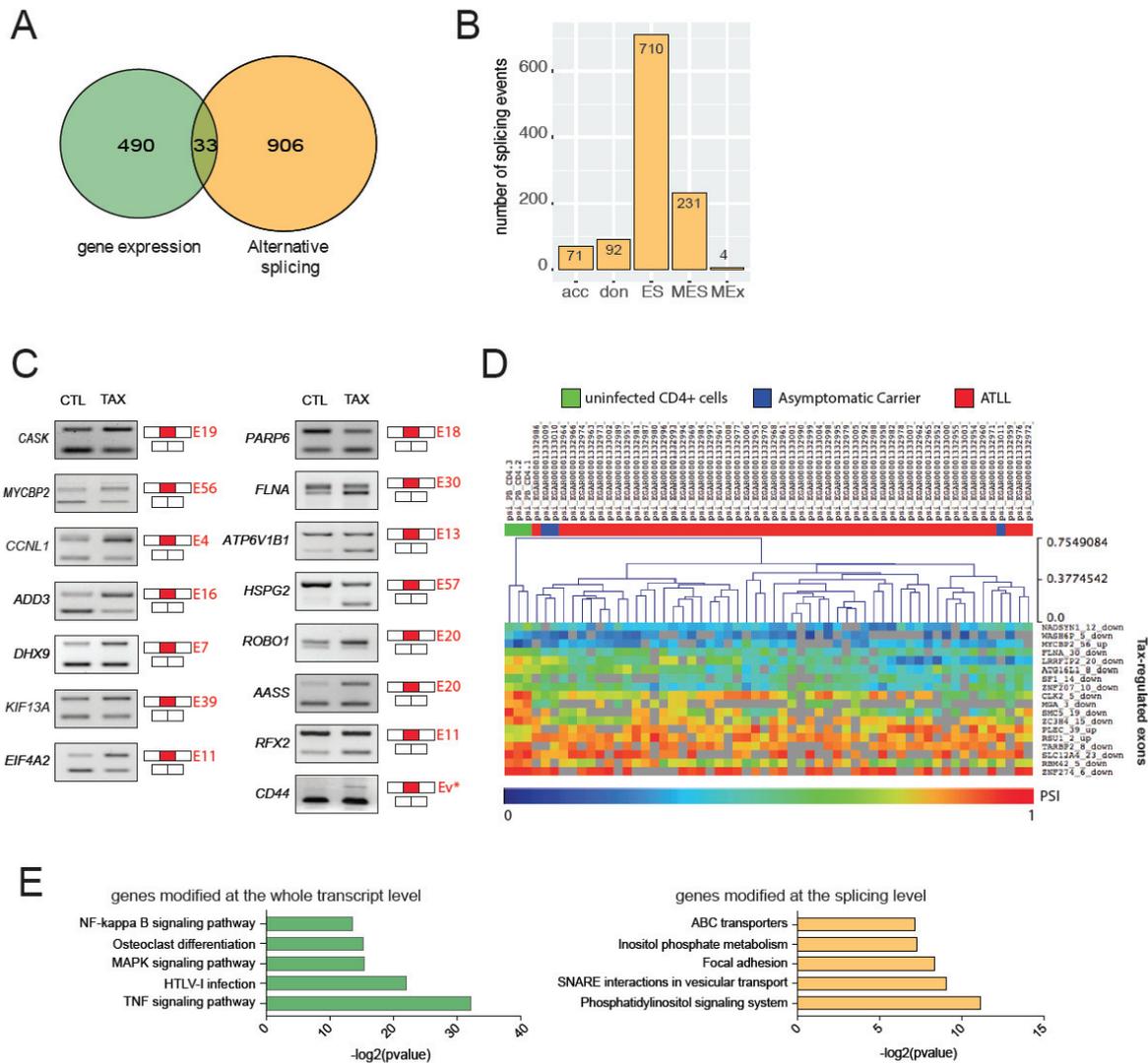
Here, we show for the first time that NF- $\kappa$ B activation accounts for alternative splicing modifications generated upon TAX expression. These effects rely on a tight physical and functional interplay between TAX, RelA and the DDX17 splicing factor. Our results reveal that DNA binding of RelA at the vicinity of genomic exons regulates alternative splicing through the recruitment of DDX17, which modulates exon inclusion thanks to its RNA helicase activity.

## Results

### **TAX induces alternative splicing modifications irrespectively of its effects on transcription.**

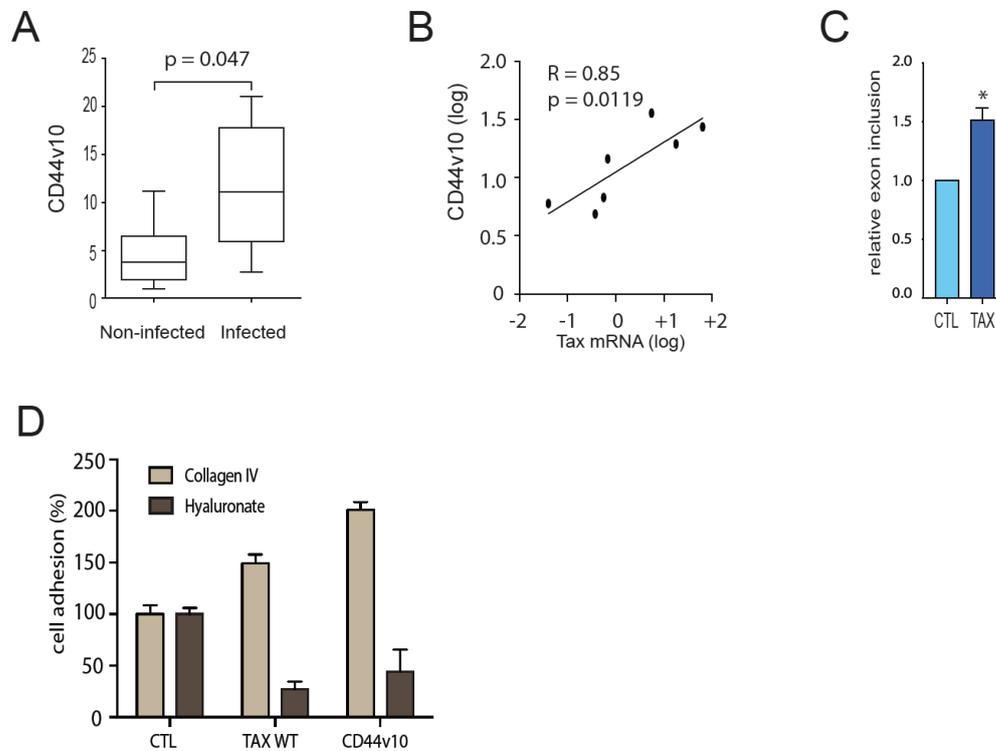
RNA-seq analyses were performed on 293T-LTR-GFP cells transiently transfected with a TAX expression vector. TAX-induced changes in gene expression level and in alternative splicing were identified and annotated as previously described<sup>22,23</sup>(Table S1). As shown in Figure 1A, the ectopic expression of TAX affected the splicing and gene expression levels of 939 and 523 genes, respectively. A total of 1108 alternative splicing events were predicted including 710 exon skipping events (Figure 1B). A minority of genes (3.5%, 33/939) was altered at both the expression and splicing levels, indicating that TAX largely affects alternative splicing independently of its transcriptional activity. A subset of splicing events was validated by RT-PCR (Figure 1C). We took advantage of RNA-seq datasets (EGAS00001001296<sup>24</sup>) for assessing whether TAX-related alternative splicing could pertain to asymptomatic carriers (AC) and ATLL patients. Overall, 542 (48%) TAX-induced splicing modifications were detected at least once across 55 clinical samples (Table S1). Hierarchical clustering of these exons based on their inclusion rate (PSI) identified TAX-regulated exons that discriminate AC and ATLL samples from uninfected CD4+ T-cells (Figure 1D). We furthermore confirmed that TAX promotes splicing events previously detected in HTLV-1 infected individuals, including *AASS*, *CASK*, *RFX2* and *CD44*<sup>4,25</sup>. We firmly established that the expression of the splicing variant *CD44v10* previously identified in HAM/TSP patients<sup>25</sup> fully relies on TAX expression (Figure 1C and Figures S1A-C). Altogether, these results uncovered a large number of splicing modifications upon TAX expression that for a part coincide with alternative splicing events observed in HTLV-1 patients.

Gene ontology analysis of quantitatively altered genes revealed several signaling pathways that are well described in TAX expressing cells, including NF- $\kappa$ B, TNF, and MAPK signaling (Figure 1E)<sup>26,27</sup>. In contrast, genes modified at the splicing level belong to membrane-related regulatory processes including focal adhesion and ABC transporters (Figure 1E). In this setting, we observed that TAX-expressing cells displayed switched cell adhesion properties from hyaluronate- to type IV collagen-coated surfaces, which is in accordance with the substrate affinity of the *CD44v10* isoform<sup>28</sup> (Figure S1D).



**Figure 1: TAX induces alternative splicing modifications independently of its transcriptional effects.**

(A) Genes regulated at the steady-state expression level and at the splicing level upon TAX expression. The significance thresholds were typically set to 10% for  $\Delta$ PSI (differential percentage of spliced-in sequence) and 0.6 for  $\log_2$ - gene expression changes ( $p$ -val<0.05, Fisher's exact test), respectively. (B) Different alternative splicing events induced by TAX: alternative acceptor (acc), alternative donor (don), exon skipping (ES), multi-exon skipping (MES), multi-exclusive exon skipping (MEx). (C) Validation of alternative splicing predictions by RT-PCR (35 cycles of PCR). The exon number is indicated in red. *CD44* full variants (Ev\*) were assessed using primers C13 and C12A (Figure S4). (D) Exon-based hierarchical clustering. Kruskal-Wallis ANOVA ( $p$ -val<0.05) was carried out with Mev4.0 software (<http://www.tm4.org/>) using the PSI values of exons that share similar regulations upon TAX and in clinical samples (EGAS00001001296). Only the most significant exon regulations are presented. (E) Gene ontology analysis (DAVID) of TAX splicing and transcriptional targets.



**Figure S1: TAX-induced alternative splicing of *CD44* in vivo and in vitro.**

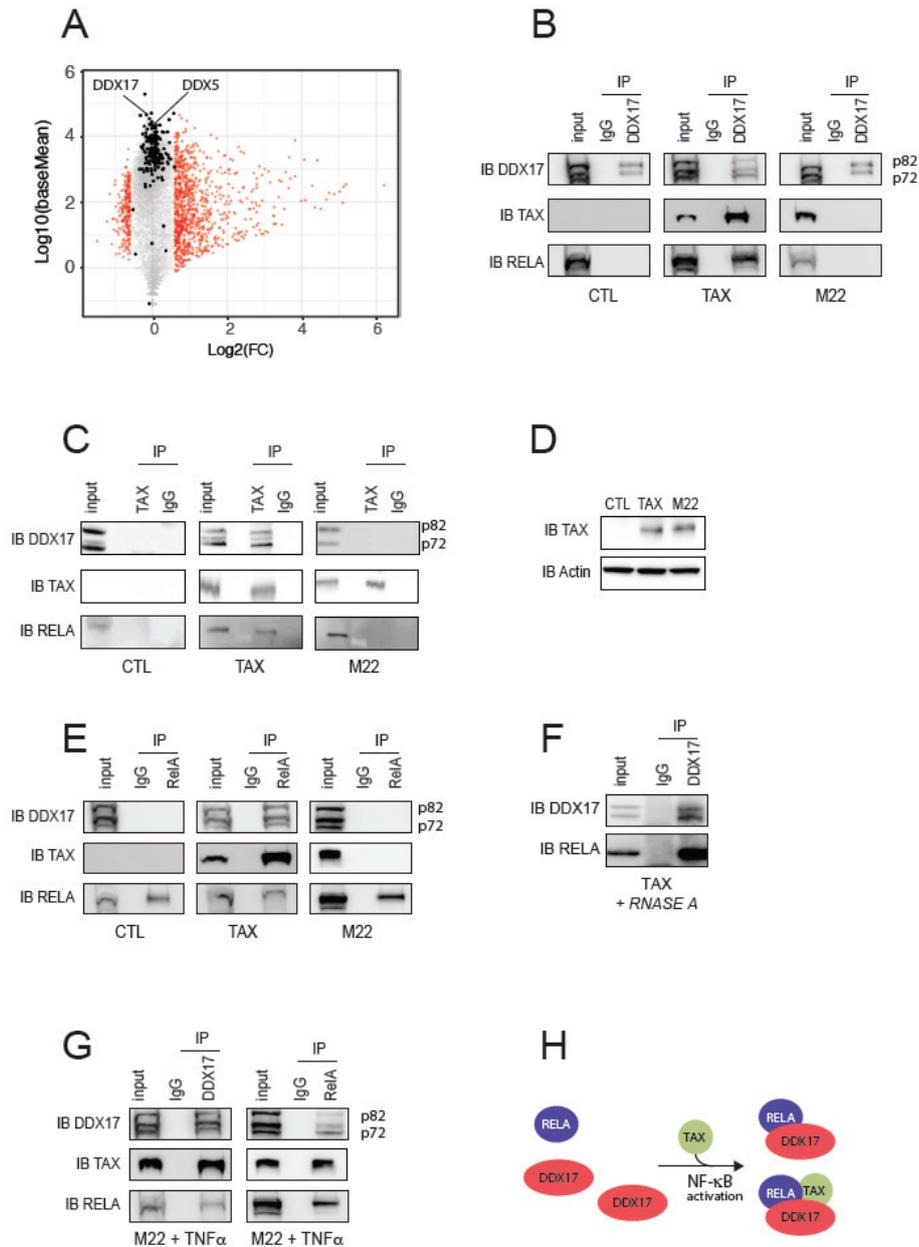
(A) Expression of the splicing variant CD44v10 in HTLV-1 positive and negative cellular clones T-CD4+ derived from HAM/TSP patients (7 cellular clones in each category). CD44v10 mRNA were quantified by qRT-PCR from total RNA extracts. Median  $\pm$ SD for non-infected vs infected clones were  $11.1 \pm 6.87$  vs  $3.7 \pm 3.57$ ; Mann Whitney test,  $p=0.047$ . (B) Positive correlation between TAX and CD44v10 mRNA expression in 7 infected CD4+ T-cell clones (Pearson correlation test). (C) qRT-PCR analysis of exon inclusion rate of CD44 exon v10 in 293 T-cells transiently transfected with pSG5M-TAX, pSG5M-M22 and empty pSG5M constructs. The relative exon inclusion of v10 corresponds to normalized v10 versus exon E16 (constitutive exon) expression levels. (D) Cell adhesion properties of cells transiently transfected with control vector, pSG5M-TAX and pCEP4-CD44V10 on plate surfaces coated with Hyaluronic acid and type IV Collagen. Histograms represent means  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

### **The splicing factor DDX17 interacts with RelA and TAX in a NF- $\kappa$ B dependent manner.**

Since Tax is a well-known trans-acting transcription regulator, we first analysed whether TAX could affect gene expression levels of splicing factors. However, no significant change was measured for 227 genes encoding splicing regulators (Table S1, Figure 2A), thereby suggesting a direct role of TAX in alternative splicing regulatory mechanisms. To tackle this question, we focused on the auxiliary component of the spliceosome DDX17, which has been previously identified, but not validated, in a recent mass spectrometry screen for putative protein partners of TAX <sup>29</sup>.

We therefore aimed to validate the interaction between TAX and DDX17. As shown in Figure 2B, TAX co-immunoprecipitated with the two endogenous isoforms of DDX17, namely p72 and p82. Reciprocal IP confirmed this interaction (Figure 2C). Due to the involvement of NF- $\kappa$ B signaling in TAX positive cells (Figure 1D, <sup>27</sup>), we examined whether DDX17 interacts with a TAX mutated form, namely M22 (G137A, L138S), which is defective for IKK and NF- $\kappa$ B activation <sup>30-33</sup>. Despite similar expression levels and immunoprecipitation efficiencies of TAX and M22 (Figure 2D), we failed to detect any interaction between M22 and DDX17 (Figures 2B and 2C), suggesting that NF- $\kappa$ B is required for recruiting DDX17. In this setting, RelA co-immunoprecipitated with DDX17 and TAX, but not with M22 (Figures 2B and 2C). Moreover, DDX17 was co-immunoprecipitated with RelA in a TAX-dependent manner (Figure 2E). This interaction did not require RNA since the DDX17:RelA complex remained detected when cell extracts were pre-treated with RNase A (Figure 2F).

As DDX17:RelA complexes were observed neither in control cells (that do not expressed TAX) nor in M22 expressing cells, this suggested that NF- $\kappa$ B activation is necessary for the binding of DDX17 to RelA. This hypothesis was confirmed by exposing TAXM22-expressing cells to TNF $\alpha$ , a potent NF- $\kappa$ B activator that allowed to retrieve DDX17:RelA complexes (Figure 2G). Altogether, these results revealed that TAX-induced NF- $\kappa$ B activation dynamically orchestrates the interactions between TAX, the transcription factor RelA and the splicing regulator DDX17 (Figure 2H).



**Figure 2: Physical interactions between TAX, RelA and DDX17 in an NF- $\kappa$ B dependent manner.**

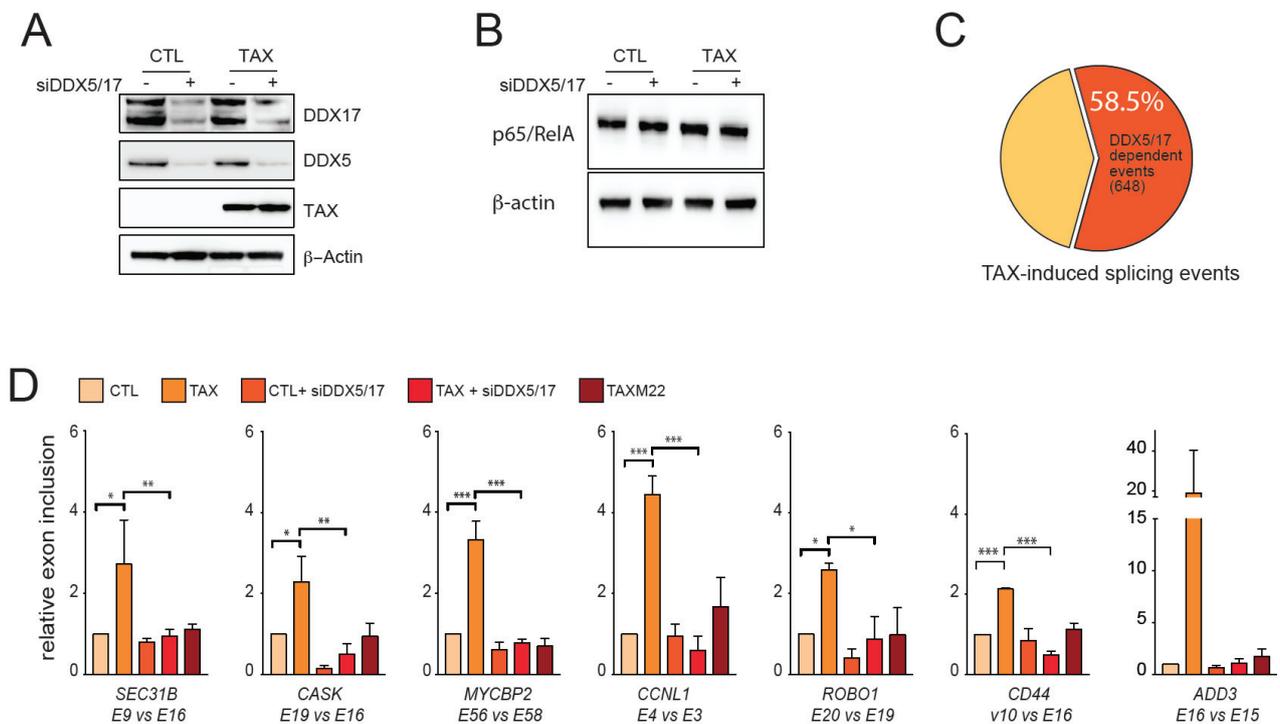
(A) Mean average plot (n=3, p<0.05) of cellular gene expressions upon TAX. Each gene is plotted according to its expression level (Log<sub>10</sub>(BaseMean) from DESeq2 analysis) and to fold change (Log<sub>2</sub>-FC) upon TAX. Red dots show significant gene expression changes (Log<sub>2</sub>-FC>0.6, p-val<0.05, Fisher's exact test). Black dots highlight genes encoding splicing factors. DDX5 and DDX17 are indicated. (B) Immunoprecipitation assays (IP) were carried out using isotype IgG or anti-DDX17 (B and G), anti-RelA (E and G) and anti-TAX (C and G) antibodies, followed by immunoblotting (IB) with indicated antibodies. (D) Western blot analysis of TAX and M22 expression 48h post-transfection. (F) RNA-free IP assays. (G) TNF $\alpha$  exposure of M22 expressing cells promotes RelA-DDX17 interactions. (H) Model of NF- $\kappa$ B-dependent interplay between TAX, RelA and DDX17.

### **TAX-mediated effects on splicing depend on DDX5/17.**

To estimate the role of DDX17 in TAX-regulated splicing events, RNA-sequencing was performed using 293T-LTR-GFP cells expressing or not TAX and depleted or not for DDX17 and its paralog DDX5, which cross-regulate and complement each other<sup>22,34,35</sup>. TAX had no effect on the expression of DDX5 and DDX17 (Figures 2A and 3A) and RelA protein level was not significantly changed upon both TAX expression and *DDX5/17* silencing (Figure 3B).

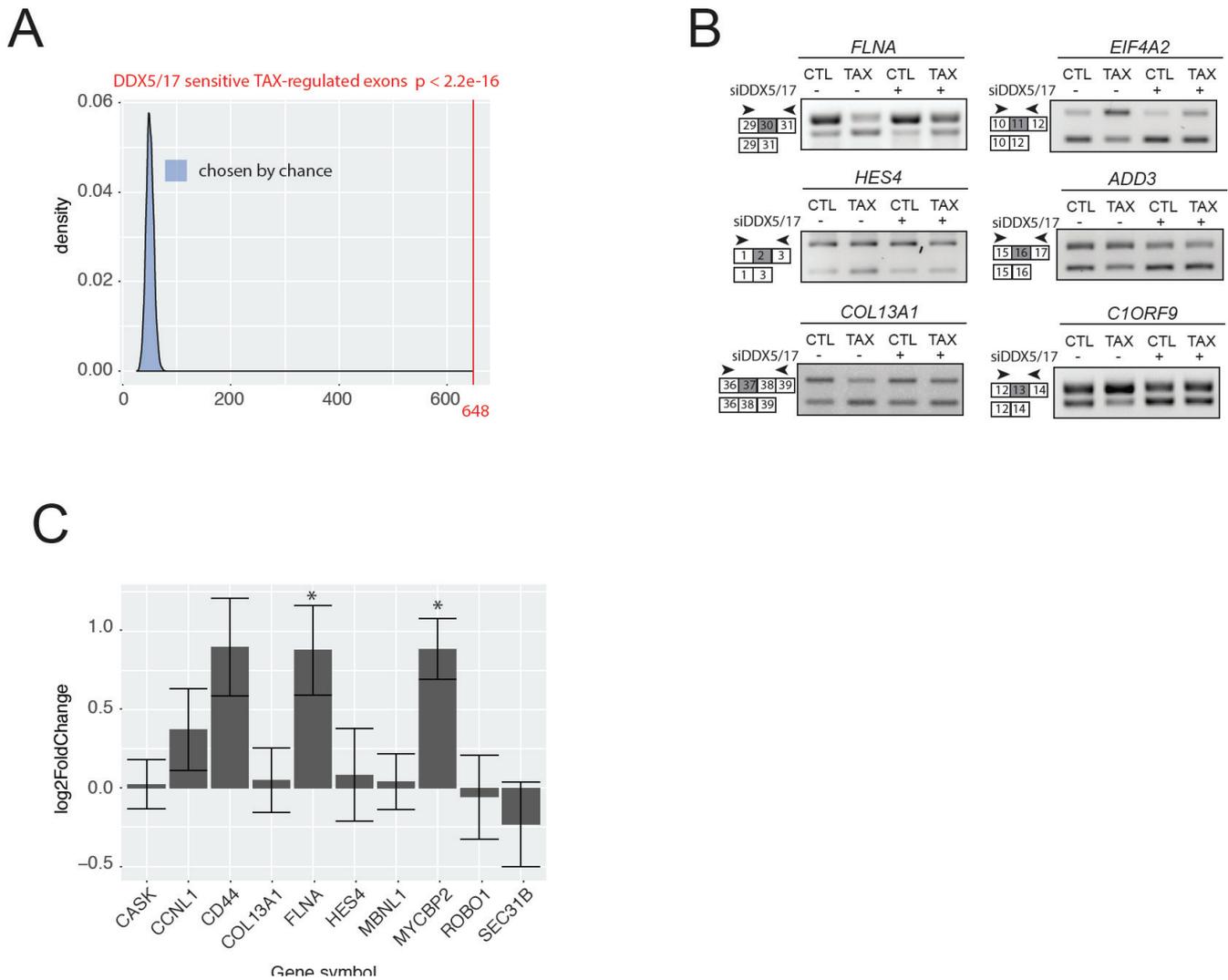
Overall, 58.5% (648/1108) of TAX-regulated exons were affected by *DDX5/17* knockdown, a significantly higher proportion than expected by chance (Figure 3C, Figure S2A). Of particular significance, 423 TAX-induced splicing events were completely dependent on the presence of DDX5/17 (Table S3). For example, *DDX5/17* silencing completely abolished the TAX-mediated effect on splicing of *SEC31B*, *CASK*, *MYCBP2*, *CCNL1*, *ROBO1*, *ADD3* and *CD44* transcripts (Figure 3D). Of note, splicing specific RT-PCR assays permitted to validate the effect of DDX5/17 on TAX-dependent splicing changes for *CD44*, *ADD3* and *EIF4A2* transcripts, even though their predicted differential inclusion fell below the arbitrary computational threshold (Table S3, Figure 3D and Figure S2D). This suggested that the contribution of DDX5/17 to TAX-mediated alternative splicing regulation might be under-estimated.

Finally, since NF- $\kappa$ B activation modified the interactions between DDX17, RelA, and TAX (Figure 2), we examined the interplay between NF- $\kappa$ B activation and DDX17-mediated splicing regulation. As shown in Figure 3D, M22 did not have any effect on DDX5/17-sensitive splicing events, arguing that TAX splicing targets are regulated by RNA helicases DDX5/17 in an NF- $\kappa$ B dependent manner.



**Figure 3: DDX5/17 regulates TAX splicing targets in an NF-κB-dependent manner.**

(A) Western blot analysis of DDX5 and DDX17 expression in cells expressing or not TAX and depleted or not of DDX5 and DDX17 by siRNA. (B) Western blot analysis of RelA and β-actin upon TAX expression and siRNA DDX5/17 delivery. (C) Splicing events modified upon the depletion of DDX5/17 in TAX positive cells. The significant threshold was set to  $\geq 2$  in comparisons between TAX vs CTL and TAX siDDX5/17 vs CTL. (D) Validation of alternative splicing predictions of a set of TAX- and DDX5/17-regulated exons. Histograms represent the results of exon specific quantitative RT-PCR measurements computed as a relative exon inclusion (alternatively spliced exon vs constitutive exon reflecting the total gene expression level) from three biological replicates  $\pm$  s.d.. All of these genes but MYCBP2 were unmodified at the whole transcript level upon TAX expression (Figure S2C).



**Figure S2: DDX5/17 expression regulate TAX splicing targets.**

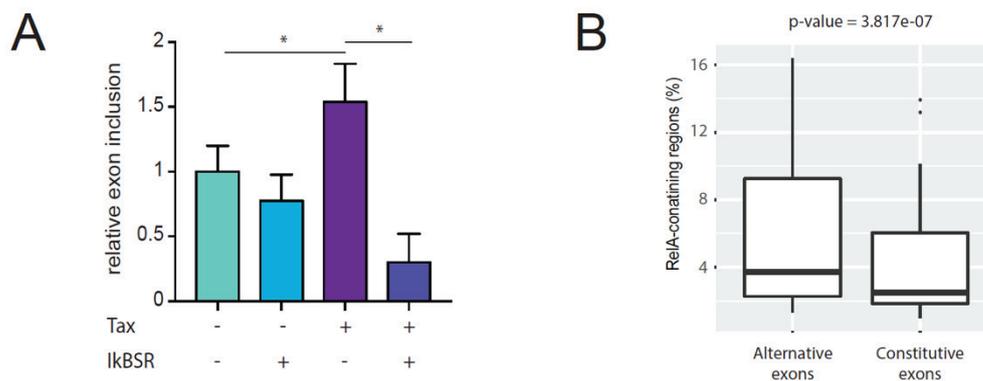
(A) Bootstrapped distribution of DDX5/17 sensitive TAX-regulated exons and 648 randomly chosen exons (10000 repetitions) among overall expressed exons (blue). One Sample t-test  $p = 2.2e-16$ . (B) Validation of RNA-seq data using exon specific RT-PCR. (C) Fold change in gene expression of TAX-regulated exons responsive to DDX5/17 upon TAX expression. Values were obtained from DESeq2 analysis of RNA-seq data and expressed as  $\text{Log}_2(\text{FoldChange})$ . Histograms represent means  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (\*)  $p\text{-val} < 0.05$  (Mann Whitney test).

**RelA binds to genomic exons and recruits DDX17 to regulate splicing in an RNA helicase-dependent manner.**

The results described above prompted us to hypothesize that the nuclear translocation of RelA upon TAX expression might promote the chromatin recruitment of DDX17 to RelA target genes. To test this hypothesis, the *CD44* gene was used as a gene model. *CD44* is composed of 10 constitutive exons and 10 variable exons. The constitutive exons 1–5 and 15–20 encode the standard *CD44* transcripts, while *CD44* variants (*CD44v*) are produced by extensive splicing leading to alternative inclusion of variable exons 5a-14 also named v1-v10 (Figure 4A)<sup>36</sup>. As shown above (Figure 3D), the exon v10 inclusion rate is markedly influenced by TAX in a DDX5/17- and NF- $\kappa$ B activation-dependent manner. The importance of NF- $\kappa$ B in this process was further confirmed as the inactivation of NF- $\kappa$ B *via* the ectopic expression of the I $\kappa$ B $\alpha$  super repressor (IkBSR) abolished the effects of TAX on *CD44* v10 inclusion (Figure S3A).

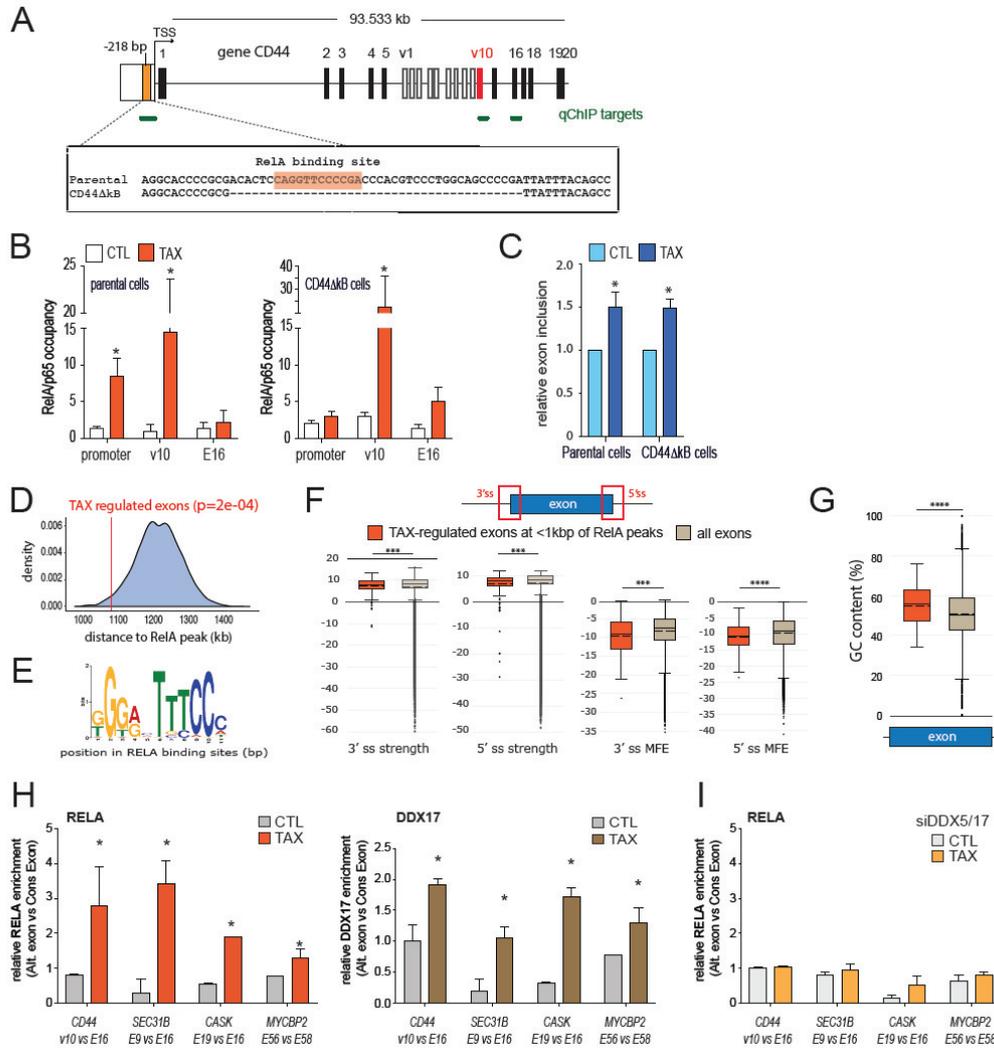
Quantitative ChIP (qChIP) analyses revealed that RelA was recruited upon TAX expression not only to the *CD44* promoter, but also to a genomic region spanning the alternative exon v10, but not a downstream constitutive exon (E16) (Figures 4A and 4B, left panel). To assess whether RelA occupancies at the v10 exon and *CD44* promoter are interrelated, a stable cell line was generated in which the  $\kappa$ B site localized at -218 bp from the transcription start site (TSS) was deleted using a CRISPR-Cas9 approach. Positive clones (*CD44* $\Delta$  $\kappa$ B) were screened and sequenced to confirm the 40 bp deletion in the promoter region (Figure 4A). As expected, TAX expression failed to promote RelA binding at the promoter in *CD44* $\Delta$  $\kappa$ B cells (Figure 4B, right panel). Nevertheless, TAX still promoted RelA binding at the v10 region. Importantly, TAX expression induced v10 inclusion at a similar level in both *CD44* $\Delta$  $\kappa$ B and parental cells (Figure 4C). These results suggested that TAX-mediated effect on exon v10 splicing could depend on RelA binding in the vicinity of the alternative v10 exon. Supporting this hypothesis, the analysis of publicly available RelA ChIP-seq datasets revealed that intragenic RelA peaks are significantly closer to alternative exons than to constitutive exons (Figure S3B). In this setting, we observed that RelA binding sites are often found in the vicinity of TAX regulated exons (Figure 4D). Using the MEME-ChIP suite as motif discovery algorithm<sup>37</sup>, we uncovered that RelA-binding sites located within the closest range (<1kbp) of TAX-regulated exons coincided with the typical NF- $\kappa$ B consensus motif (Figure 4E). Furthermore, this subset of TAX-regulated

exons displayed weak 3' and 5' splice sites together with significant low MFE value (Figure 4F) and high GC-content (Figure 4G) when compared to all human exons. This emphasizes the high potential of these splice sites to form stable secondary RNA structures, a typical feature of exons regulated by RNA helicases DDX5/17<sup>34</sup>. Taken together, these data define a signature of splicing target specificity for RelA, and they suggest that RelA and DDX17 might control together the inclusion of a subset TAX-regulated exons. We therefore investigated the genomic occupancy of some target exons by RelA and DDX17 by qChIP analysis of cells expressing or not TAX. For all tested genes (*CD44*, *SEC31B*, *CASK*, and *MYCBP2*), both RelA and DDX17 bound specifically the regulated alternative exon in a TAX-dependent manner, compared to a downstream constitutive exon (Figure 4H). Furthermore, RelA binding was lost in cells depleted for DDX5/17, indicating that RNA helicases contribute to stabilize DNA-bound RelA (Figure 4I).



**Figure S3: Chromatin tethering of RelA and DDX17 regulates alternative splicing.**

(A) TAX-induced exon inclusion of *CD44* exon v10 relies on NF- $\kappa$ B activation. 293T-LTR-GFP cells were transiently transfected with the TAX vector along with the I $\kappa$ BSR expression vector and the corresponding empty control vectors. The inclusion rate of exon v10 was quantified by qRT-PCR. Histograms represent means  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (\*)  $p < 0.05$  (Mann-Whitney test). (B) Distribution of constitutive and alternative exons in RelA-enriched intragenic regions (3 kb). ChIP-seq datasets were analysed as detailed in method section. We excluded RelA peaks localized in intergenic regions and exons linked to specific events like promoters, alternative first/last and mutually exclusive exons. The groups “Constitutive exons” and “Alternative exons” contained 41873 and 103000 exons, respectively. The window was fixed to 3 kb upstream and downstream of each exon coordinates. P-value was calculated using the Mann-Whitney test.



**Figure 4: RelA locally recruits DDX17 at the genomic target exons for regulating splicing.**

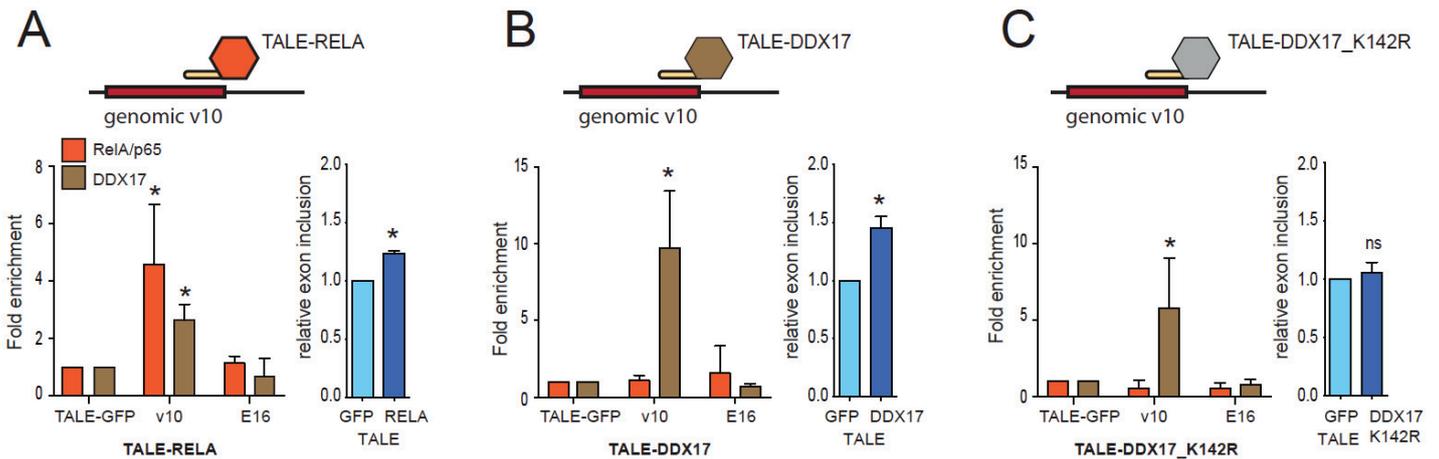
(A) Schematic representation of the human *CD44* gene. Black and white boxes represent constitutive and alternative exons as previously annotated (50), respectively. The orange box represents the  $\kappa$ B site localized at -218 bp from the TSS and the 40 bp fragment deleted by CRISPR/Cas9 in *CD44* $\Delta$ kB cells. (B) qChIP analysis of RelA occupancy across the promoter, the exon v10, and the constitutive exon E16 of *CD44*. The RelA enrichment is expressed as the fold increase in signal relative to the background signal obtained using a control IgG. (C) Relative exon inclusion of *CD44* exon v10 were quantified by qRT-PCR in parental cells and its *CD44* $\Delta$ kB counterparts. The histogram shows mean  $\pm$  sd of three independent experiments. (D) Bootstrapped distribution of median distance between intragenic RelA peaks and either TAX-regulated exons (red line, 1079 bp) or randomly chosen exons (10000 repetitions) (blue).  $p$ val : sample t-test (E) Consensus de novo motif for RelA binding sites <1kbp of TAX regulated exons. (F) Strength and minimum free energy (MFE) of 3' and 5' splice sites, and GC content (G) of TAX-regulated exons localized at <1kbp of RelA binding site. The exons of FasterDB database were used as control. (H) Relative RelA and DDX17 occupancies at TAX-regulated exons in control and TAX expressing cells. For each gene, the binding of RelA or DDX17 to the regulated exon is represented as a comparison to the binding to a neighbouring constitutive exon (\* $p$ -val $\leq$ 0.05). (I) Relative RelA occupancy at TAX-regulated exons in cells treated with DDX5/17-specific siRNA and expressing or not TAX. Details are as in D. (\* $p$  $\leq$ 0.05, \*\*\* $p$  $\leq$ 0.001, \*\*\*\* $p$  $\leq$ 0.0001, Mann-Whitney test)

### **A causal relationship between exonic DNA-binding of RelA, chromatin recruitment of DDX17, and splicing regulation.**

To assess the causative relationship that links RelA and DDX17 to alternative splicing, we intended to experimentally tether DDX17 or RelA at the *CD44* v10 exon locus using modified TALE (Transcription-Activator-Like-Effector)<sup>38</sup>. We designed a TALE domain that recognizes specifically an exonic 20 bp DNA sequence located 12 bp upstream from the 5' splice site (SS) of exon v10. This TALE domain was either fused to RelA or DDX17 proteins (Figure 5). We also used an additional construct consisting in the same TALE fused to GFP to rule out non-specific effects resulting from the DNA binding of the TALE. Each TALE construct was transiently transfected into 293T-LTR-GFP cells, and we monitored their relative effects both on the recruitment of endogenous RelA and DDX17, and on the splicing of exon v10. All results shown in Figure 5 were normalized and expressed as relative effects compared to the TALE-GFP. As expected, and validating our approach, TALE-RelA tethering to the exon v10 led to a significant chromatin recruitment of RelA to its target site, and not to the downstream exon E16 used as control (Figure 5A, left panel). A significant and specific enrichment of DDX17 was also observed on exon v10 upon expression of the TALE-RelA compared to TALE-GFP (Figure 5A, left panel), indicating that tethering RelA to exon v10 induced a local recruitment of endogenous DDX17 proteins. At the RNA level, this TALE-RelA-mediated recruitment of DDX17 coincided with a significant increase in exon v10 inclusion rate (Figure 5A).

We next investigated whether DDX17 tethering could result in similar effects. Quantitative ChIP analysis demonstrated that DDX17 was properly tethered to exon v10 when fused to the designed TALE (Figure 5B) but TALE-DDX17 had no effect on RelA recruitment (Figure 5B). This was expected since the formation of RelA:DDX17 complexes only occurs upon NF- $\kappa$ B activation (Figure 2). Nevertheless, TALE-DDX17-expressing cells exhibited a reproducible and significant increase in v10 inclusion (Figure 5B), indicating that chromatin-bound DDX17 alone can modulate splicing efficiency. It is worth to underline that the level of v10 exon inclusion induced by the TALE-RelA and -DDX17 was comparable to that measured in cells transiently transfected with a TAX expression vector (Figure 4C and Figure S1C). Although it is less quantitative approach, a nested RT-PCR assay clearly confirmed these results (Figure S4). Strikingly however, the TALE-DDX17\_K142R (a DDX17 helicase mutant<sup>34,39-41</sup>) failed to

influence exon v10 inclusion despite a clear chromatin enrichment of DDX17 (Figure 5C, Figure S4). Collectively, these results demonstrate that the binding of RelA at the vicinity of genomic exons recruits the RNA helicase DDX17 that positively regulates the inclusion rate of the target exon thanks to its RNA helicase activity.



**Figure 5: Chromatin and splicing regulation upon TALE-mediated tethering of RelA and DDX17.**

(A) The TALE domain was designed to bind the v10 exon of *CD44* and fused to either GFP (A-C), RelA (A), DDX17 (B) or its helicase-deficient mutant DDX17\_K142R (C). The effect of TALEs on RelA and DDX17 chromatin enrichment (left panels) and on the relative v10 exon inclusion (right panels) was monitored by qChIP and qRT-PCR, respectively. Results were normalized to measures obtained in TALE-GFP assays. Mean  $\pm$  sd of three independent experiments are shown (\*p-val<0.05).

A

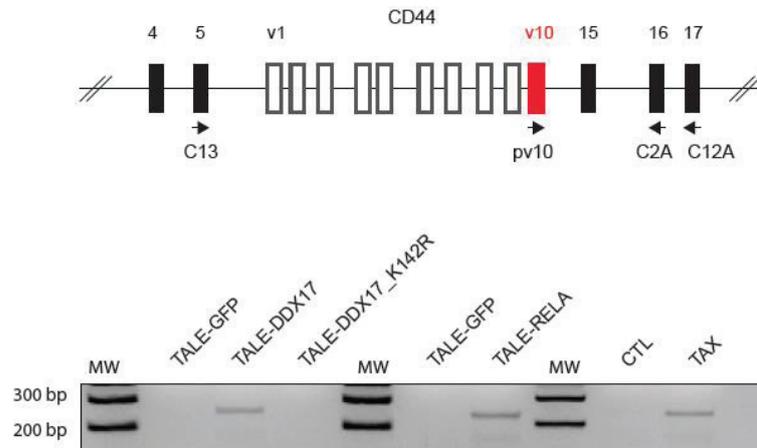


Figure S4: Nested RT-PCR analysis of *CD44* transcripts expressed in TALE assays and in cells expressing or not TAX.

Oligonucleotides were previously described (36). The first round of amplification consisted in 15 cycles of PCR with the primers C13 and C12A, the second round consisted in 35 cycles with primers pv10 and C2A. Final PCR products were resolved on Agarose gel (1%).

## DISCUSSION

Since the finding of splicing dysregulations in HTLV-1 infected individuals<sup>4,24,25,42</sup>, deciphering how HTLV-1 interferes with the splicing regulatory network has become a new challenging issue for improving our knowledge of HTLV-1 infection and its associated diseases. Here, we provide the first molecular evidence that upon TAX-induced NF- $\kappa$ B activation, RelA directly regulates splicing by binding to gene bodies at the vicinity of GC-rich exons and by locally recruiting the splicing factor DDX17, which regulates splicing via its RNA helicase activity.

Our results demonstrate for the first time that TAX deeply impacts alternative splicing independently from its effects on transcription. In addition, TAX-regulated exons were found in transcripts enriched in functional pathways that are distinct from those enriched by TAX transcriptional targets, suggesting that splicing reprogramming may constitute an additional layer of regulations by which HTLV-1 modifies the host cell phenotype. Arguing for this, we showed that the TAX-induced splicing variant *CD44v10*, which was previously identified in circulating blood of HAM/TSP patients<sup>25</sup> and confirmed here *ex vivo* in infected CD4+ T-cell clones, contributes to modulate cell adhesion affinity *in vitro*. GO analyses of TAX splicing targets also pointed to the phosphatidylinositol signaling system and to the inositol phosphate metabolism, two processes that are particularly connected to NF- $\kappa$ B signaling and that play critical roles in oncogenesis and disease progression of malignant diseases, including ATLL<sup>43,44</sup>. This suggests that, besides its transcriptional effects, splicing regulatory functions of TAX might account for its oncogenic properties. Accordingly, a large number of TAX-regulated exons could be observed in ATLL samples, which rarely express TAX but typically exhibit NF- $\kappa$ B addiction for survival and proliferation<sup>24,45,46</sup>.

At the molecular level, we showed that the increased chromatin occupancy of RelA upon TAX expression is not restricted to promoter regions but also occurs in the vicinity of exons that are regulated at the splicing level (Figure 4). Exons regulated by TAX, especially those localized within 1 kb of intragenic RelA binding sites, are characterized by a high GC-content, a typical feature of exons regulated by the DDX5 and DDX17 RNA helicases<sup>34</sup> (Figure S3D). Accordingly, we found that a majority of TAX-regulated exons depend on the expression of these proteins (Figure 3). A local chromatin recruitment of DDX17 and RelA was validated on several TAX-

regulated exons (Figure 4). More importantly we identified a confident causal relationship between the exonic tethering of RelA, the local chromatin recruitment of DDX17, and the subsequent splicing regulation via DDX17 RNA helicase activity. This catalytic activity of DDX17 is strictly required for its splicing regulatory functions (Figure 5), as previously reported<sup>34</sup>. Indeed, the RNA helicase activity of DDX5 and DDX17 has been involved in resolving RNA structures, facilitating the recognition of the 5' splice site, that can be embedded in secondary structures, and exposing RNA binding motifs to additional splicing regulators<sup>34,40,47-49</sup>. However, even though some RNA binding specificity has been reported for DDX17<sup>50,51</sup>, these RNA helicases are devoid of a proper RNA binding domain and their activity in splicing may depend on additional factors that are able to provide target specificity. Here, we suggest that RelA may be also regarded as a DDX17 recruiter by acting as a chromatin anchor for DDX17 in the vicinity of exons dynamically selected upon NF- $\kappa$ B activation.

The target specificity of NF- $\kappa$ B factors remains a complex question. It has been estimated that approximately 30 to 50% of genomic RelA binding sites do not harbor a typical NF- $\kappa$ B site, and that only a minority of RelA-binding events associate with transcriptional change<sup>16-19</sup>, thereby indicating that neither a consensus site nor significant NF- $\kappa$ B occupancy are sufficient criteria for defining RelA's target specificity. Here, we identified a typical  $\kappa$ B consensus motif at RelA-binding loci that are close to alternatively spliced exons but we also uncovered that weak splice sites, low MFE, and significant GC-content bias of exons likely contribute to RelA's target specificity. Because low MFE and high GC-content confer a high propensity to form stable RNA secondary structures, the recognition and the selection of such GC-rich exons with weak splice sites by the splicing machinery typically depend on RNA helicases DDX5/17<sup>34</sup>. Based on these observations we propose that, upon TAX-induced NF- $\kappa$ B activation, RelA binds to intragenic binding consensus motifs and locally recruits DDX17. When the RelA:DDX17 complex is located at a close proximity of GC-rich exons flanked by weak splice sites, DDX17 can impact on their inclusion rate by unwinding GC-rich secondary structures of the nascent RNA transcript, and by potentially unmasking binding motifs for additional splicing regulators.

In conclusion, our results provide conceptual advance for understanding how cell signaling pathways may drive target specificity in splicing by dynamically recruiting cognate

transcription factors at the vicinity of target exons that act as chromatin anchor for splicing regulators. In the context of NF- $\kappa$ B signaling, such mechanism likely has a significant impact on cell fate determination and disease development associated with HTLV-1 infection, but also on other situations linked to chronic NF- $\kappa$ B activation, as numerous human inflammatory diseases and cancer.

## **Acknowledgments**

This study makes use of data (EGAS00001001296) generated by Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University<sup>24</sup>. We gratefully acknowledge support from the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) of the ENS de Lyon for the computing resources. This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité de la Savoie, de la Drome et du Rhône), the Fondation ARC (ARC PJA20151203399), and the Agence Nationale pour la Recherche (program EPIVIR and CHROTOPAS). L.B.A was supported by Ligue Contre le Cancer. G.G was support by ANR CHROTOPAS. M.T. was supported by a bursary from the French Ministry of Higher Education and Science. F.M., C.F.B, and D.A. were supported by INSERM. E.W. was supported by Hospices Civils de Lyon and Lyon I University (France).

## **Author Contributions**

Conceptualization, L.B.A., D.A. and F.M.; Resources, A.G. and E.W.; Experiments, L.B.A., M.T., and G.G.; Technical Support, E.C. and M.B.; Bioinformatic, J.B.C., H.P. and N.F., Formal Analysis, L.B.A., M.T., G.G. and F.M.; Supervision, D.A. and F.M.; Funding Acquisition, C.F.B., D.A. and F.M.; Writing – Original Draft, F.M.; Writing – Review and Editing, L.B.A, M.T., G.G., C.F.B., D.A. and F.M.

## **Declaration of Interests**

The authors declare no competing interest.

## References

1. Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. & Uchino, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**, 481-92 (1977).
2. Gessain, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **2**, 407-10 (1985).
3. Vernin, C. et al. HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res* **74**, 6082-93 (2014).
4. Thenoz, M. et al. HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology* **11**, 119 (2014).
5. Naftelberg, S., Schor, I.E., Ast, G. & Kornblihtt, A.R. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu Rev Biochem* **84**, 165-98 (2015).
6. Herzelt, L., Ottoz, D.S.M., Alpert, T. & Neugebauer, K.M. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 637-650 (2017).
7. Matsuoka, M. & Jeang, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* **7**, 270-80 (2007).
8. Sun, S.C. & Yamaoka, S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* **24**, 5952-64 (2005).
9. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.C. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2**(2017).
10. Hoesel, B. & Schmid, J.A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **12**, 86 (2013).
11. Harhaj, E.W. & Giam, C.Z. NF-kappaB signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J* (2018).
12. Harhaj, E.W. & Sun, S.C. IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem* **274**, 22911-4 (1999).
13. Jin, D.Y., Giordano, V., Kibler, K.V., Nakano, H. & Jeang, K.T. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J Biol Chem* **274**, 17402-5 (1999).
14. Lacoste, J., Lanoix, J., Pepin, N. & Hiscott, J. Interactions between HTLV-I Tax and NF-kappa B/Rel proteins in T cells. *Leukemia* **8 Suppl 1**, S71-6 (1994).
15. Suzuki, T., Hirai, H. & Yoshida, M. Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* **9**, 3099-105 (1994).
16. Martone, R. et al. Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12247-52 (2003).
17. Lim, C.A. et al. Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol Cell* **27**, 622-35 (2007).
18. Zhao, B. et al. The NF-kappaB genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep* **8**, 1595-606 (2014).
19. Xing, Y., Yang, Y., Zhou, F. & Wang, J. Characterization of genome-wide binding of NF-kappaB in TNFalpha-stimulated HeLa cells. *Gene* **526**, 142-9 (2013).

20. Kolovos, P. et al. Binding of nuclear factor kappaB to noncanonical consensus sites reveals its multimodal role during the early inflammatory response. *Genome Res* **26**, 1478-1489 (2016).
21. Farnham, P.J. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* **10**, 605-16 (2009).
22. Lambert, M.P. et al. The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res* (2018).
23. Benoit-Pilven, C. et al. Complementarity of assembly-first and mapping-first approaches for alternative splicing annotation and differential analysis from RNAseq data. *Sci Rep* **8**, 4307 (2018).
24. Kataoka, K. et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet* **47**, 1304-15 (2015).
25. Matsuoka, E. et al. CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J Neuroimmunol* **102**, 1-7 (2000).
26. Mizuguchi, M. et al. Induction of Cell Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax. *PLoS One* **11**, e0148217 (2016).
27. Harhaj, E.W. & Giam, C.Z. NF-kappaB signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J* **285**, 3324-3336 (2018).
28. Weimann, T.K., Wagner, C., Goos, M. & Wagner, S.N. CD44 variant isoform v10 is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes and mediates hyaluronan-independent heterotypic cell-cell adhesion to melanoma cells. *Exp Dermatol* **12**, 204-12 (2003).
29. Gao, L. & Harhaj, E.W. HSP90 protects the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax oncoprotein from proteasomal degradation to support NF-kappaB activation and HTLV-1 replication. *J Virol* **87**, 13640-54 (2013).
30. Robek, M.D. & Ratner, L. immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol* **73**, 4856-65 (1999).
31. Harhaj, E.W., Good, L., Xiao, G. & Sun, S.C. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* **18**, 1341-9 (1999).
32. Smith, M.R. & Greene, W.C. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* **4**, 1875-85 (1990).
33. Xiao, G., Harhaj, E.W. & Sun, S.C. Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK)regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J Biol Chem* **275**, 34060-7 (2000).
34. Dardenne, E. et al. RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep* **7**, 1900-13 (2014).
35. Geissler, V., Altmeyer, S., Stein, B., Uhlmann-Schiffler, H. & Stahl, H. The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Res* **41**, 7875-88 (2013).
36. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 33-45 (2003).
37. Bailey, T.L. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202-8 (2009).

38. Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**, e82 (2011).
39. Laurent, F.X. et al. New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res* **40**, 3159-71 (2012).
40. Kar, A. et al. RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol Cell Biol* **31**, 1812-21 (2011).
41. Dardenne, E. et al. Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1139-46 (2012).
42. Rosewick, N. et al. Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat Commun* **8**, 15264 (2017).
43. Nakahata, S. et al. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun* **5**, 3393 (2014).
44. Bai, D., Ueno, L. & Vogt, P.K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* **125**, 2863-70 (2009).
45. Yamagishi, M. et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* **21**, 121-35 (2012).
46. Mahgoub, M. et al. Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, E1269-E1278 (2018).
47. Sithole, N., Williams, C.A., Vaughan, A.M., Kenyon, J.C. & Lever, A.M.L. DDX17 Specifically, and Independently of DDX5, Controls Use of the HIV A4/5 Splice Acceptor Cluster and Is Essential for Efficient Replication of HIV. *J Mol Biol* **430**, 3111-3128 (2018).
48. Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y. & Liu, Z.R. ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol Cell Biol* **25**, 7484-93 (2005).
49. Camats, M., Guil, S., Kokolo, M. & Bach-Elias, M. P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS One* **3**, e2926 (2008).
50. Moy, R.H. et al. Stem-loop recognition by DDX17 facilitates miRNA processing and antiviral defense. *Cell* **158**, 764-777 (2014).
51. Mori, M. et al. Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell* **156**, 893-906 (2014).
52. Delebecque, F., Pramberger, K., Prevost, M.C., Brahic, M. & Tangy, F. A chimeric human T-cell lymphotropic virus type 1 with the envelope glycoprotein of Moloney murine leukemia virus is infectious for murine cells. *J Virol* **76**, 7883-9 (2002).
53. Mallinjoud, P. et al. Endothelial, epithelial, and fibroblast cells exhibit specific splicing programs independently of their tissue of origin. *Genome Res* **24**, 511-21 (2014).
54. Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-9 (2015).
55. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
56. Messeguer, X. et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**, 333-4 (2002).

57. Yeo, G. & Burge, C.B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* **11**, 377-94 (2004).
58. Barrett, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* **41**, D991-5 (2013).
59. Consortium, E.P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74 (2012).
60. Zheng, R. et al. Cistrome Data Browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis. *Nucleic Acids Res* (2018).
61. Langmead, B. & Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-9 (2012).
62. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137 (2008).
63. Quinlan, A.R. & Hall, I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-2 (2010).
64. Zhu, L.J., Holmes, B.R., Aronin, N. & Brodsky, M.H. CRISPRseek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. *PLoS One* **9**, e108424 (2014).

## Supplementary data

### **Table S1: Whole gene expression and alternative splicing changes upon TAX expression.**

Whole gene expression threshold was set to  $\log_2FC=0.6$ ,  $p<0.05$ . For differential splicing,  $\Delta\Psi$  threshold was set to 1.1  $p<0.05$  (Fisher test). TAX-induced splicing regulations identified in RNA-seq datasets derived from carriers and ATLL samples (EGAS00001001296). Alternative splicing profiles of each clinical sample was assessed using Farline analysis with peripheral blood CD4+ T-cells used as control. The table lists 452 TAX-induced splicing regulations identified at least once across 56 clinical samples.

### **Table S2: sequence features of exons regulated by TAX**

### **Table S3: genes modified in splicing by TAX in a DDX5/17-dependent manner.**

TAX splicing targets responsive to DDX5/17 were attributed to splicing events lost upon DDX5/17 depletion.

### **Table S4: list of oligonucleotides, siRNA, sgRNA and TALE sequences**

## Methods

### *Cell Culture and Transfections*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll separation of whole blood of HTLV-1 infected individuals. T-cell limiting dilution cloning was performed as previously described<sup>4</sup>. The human embryonic kidney 293T-LTR-GFP cells<sup>52</sup>, which contain an integrated GFP reporter gene under the control of the TAX-responsive HTLV-1 LTR, were cultured in DMEM+Glutamax medium supplemented with decompemented 10% FBS and 1% penicilline/streptomycine. This cell line was used to measure transfection efficiency in TAX and TAX M22 conditions. In standard transfection experiments, siRNAs (Table S4) and/or expression vectors (pSG5M empty, pSG5M-TAX-WT, pSG5M-M22) were mixed with JetPrime (Polyplus-Transfection) following the manufacturer's instructions and cells were harvested 48h after transfection. TNF $\alpha$  exposure consisted in treating cells with 10ng/ml of TNF $\alpha$  for 24 hours.

### *Cell-adhesion assays*

Culture plates were prepared by coating with 40  $\mu$ g/ml hyaluronic acid from human umbilical cord (Sigma) and 25  $\mu$ g/ml type IV collagen from human placenta (Sigma) overnight at 4°C. Non-specific binding sites were blocked for 1 h with PBS containing 1 mg/ml heat-denatured BSA. After three washes with PBS,  $5 \times 10^4$  cells transiently transfected with pSG5M-TAX vector or its empty control were added at 48h post-transfection. Cell adhesion was allowed to proceed for 20 min at room temperature. Non-adherent cells were removed with 3 PBS washes, and adherent cells were quantified. All experiments were done in triplicate.

### *Western Blot*

Cells were washed twice with 1X PBS and total proteins were directly extracted in RIPA buffer (50mM Tris HCL pH 7.4, 50 mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS). A total of 20  $\mu$ g of whole cell proteins were separated on a NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels and transferred on a nitrocellulose membrane using Trans-Blot® Turbo™ Blotting System. Membranes were saturated with 5% milk and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against RelA (sc-109, Santa Cruz), Tax (1A3, Covalab), DDX17 (ProteinTech), DDX5 (ab10261 Abcam), Actin (sc-1616, SantaCruz). After three washes with 1x TBS-Tween, membranes were

incubated 1h at room temperature with the secondary antibodies conjugated with the HRP enzyme and washed 3 times as above. Finally, the HRP substrate (GE Helathcare) was applied to the membrane for 5 minutes and the chemiluminescence was read on Chemidoc (Biorad).

#### *Co-immunoprecipitation*

Cells were harvested in IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, 10% Glycerol). Extracts were incubated overnight with 5 µg of antibodies recognizing either RelA (C20 sc-372, Santa Cruz), Tax (1A3, Covalab), DDX17 (ProteinTech) in the presence of 30 µL Dynabeads® Protein A/G (Thermo Fisher). Isotype IgG rabbit (Invitrogen) or mouse (Santa Cruz) was also used as negative control. The immunoprecipitated complexes were washed three times with IP lysis buffer.

#### *Chromatin Immunoprecipitation*

A total of  $10^7$  cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature. Crosslinking was quenched by addition of 0.125 M glycine. Nuclei were isolated by sonication using a Covaris S220 (2 min, Peak Power: 75; Duty Factor: 2; Cycles/burst: 200), pelleted by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min at 4°C, washed once with FL buffer (5 mM HEPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP40) and resuspended in 1 mL shearing buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Chromatin was sheared in order to obtain fragments ranging from 200 to 800 bp using Covaris S220 (20 min, Peak Power: 140; Duty Factor: 5; Cycles/burst: 200). Chromatin was next immunoprecipitated overnight at 4°C with 5 µg of antibodies: RelA (C20 sc-372, Santa Cruz), DDX17 (19910-1-AP, ProteinTech) and V5 (AB3792, Millipore). Then, 30 µL Dynabeads® Protein A/G (Thermo Fisher) were added. Complexes were washed using 5 different buffers: Wash 1 (1% Triton, 0.1% NaDOC, 150mM NaCl, 10mM Tris HCL pH8), Wash 2 (1% NP-40, 1% NaDOC, 150mM KCl, 10mM Tris HCL pH8), Wash 3 (0.5% Triton, 0.1% NaDOC, 500mM NaCl, 10mM Tris HCL pH8), Wash 4 (0.5% NP-40, 0.5% NaDOC, 250mM LiCl, 20mM TRIS.Cl pH8, 1mM EDTA), Wash 5 (0.1% NP-40, 150mM NaCl, 20mM Tris HCL pH8, 1mM EDTA). The immunoprecipitated chromatin was purified by phenol-chloroform extraction and quantitative PCR was performed using Rotor-Gene 3000 cycler (Corbett) or LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany). Values were expressed relative to the signal obtained for the immunoprecipitation with control IgG.

Primers used for ChIP experiments were designed in exon/intron junction (Table S4). For TALE ChIP experiment, DDX17 and RelA enrichment were normalized to the signal observed with V5 antibody corresponding to TALE recruitment. Then, the TALE GFP condition was used as control and set to 1.

#### *RNA extraction, classical PCR and Real-time quantitative PCR.*

Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen). RNAs (2.5 µg) were retro-transcribed with Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit after treatment with dsDNase (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. PCRs were performed using 7.5 ng of cDNAs with GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA). PCR products were separated by ethidium bromide-labeled agarose gel electrophoresis. Band intensity was quantified using the ImageLab software (Bio-Rad). Quantitative PCR was then performed using 5 ng of cDNAs with SYBR® Premix Ex Taq TM II (Tli RNaseH Plus) on LightCycler 480 II. Relative level of the target sequence was normalized using the 18S or GAPDH gene expression ( $\Delta\text{Ct}$ ) and controls were set to 1 ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). We calculated the inclusion rate of alternative exons using the following method:  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (included exon) /  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (constitutive exon). The oligonucleotide sequences used are listed in Table S4.

#### *RNA-seq and bio-informatic analysis*

RNA-seq analyses were performed as previously described<sup>22</sup>. Briefly, poly-A transcripts were extracted from 293T-LTR-GFP cells transfected with pSG5M-Tax or pSG5M empty vectors and knockdown or not for DDX5-17. RNA-seq libraries were generated at the Aros Applied Biotechnology (Aarhus, Denmark) using Stranded mRNA Sample Prep kit (Illumina) and sequenced using the illumina HiSeq 2500 technology. Each sample have in average  $6.10^7$  of paired-end pairs of reads. These RNA-seq data were analyzed using FaRLine, a computational program dedicated to analyzing alternative splicing with FasterDB database<sup>23,53</sup>. The gene expression level in each sample was calculated with HTSeq-count (v0.7.2)<sup>54</sup> and differential expression between conditions was computed with DESeq2 (v1.10.1) ( $\text{abs}(\log_2\text{FoldChange}) \geq 0.4$ ,  $p\text{values} \leq 0.05$ )<sup>55</sup>. In silico screening of NF-κB responsive elements in the *CD44* promoter sequence was carried out via PROMO database (based on TRANSFAC v8.3)<sup>56</sup>. The MEME-ChIP suite was used to discover the regulatory motifs in the NF-κB ChIP-seq data<sup>37</sup>.

For the prediction of splice site strength, scores were computed using MaxEntScan <sup>57</sup> for sequence (3 bases in the exon and 6 bases in the intron for 5' splice sites; 20 bases in the intron and 3 bases in the exon for 3' splice sites) covering both sides of the splicing site. MaxEntScan uses Maximum Entropy Models (MEMs) to compute log odds ratios. The minimum free energy was computed from exon-intron junction sequences using RNAFold from the ViennaRNA package (v 2.4.1; <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Analyzed sequences include 25 nucleotides within the intron and 25 nucleotides within the exon. The GC content was calculated for exons defined in FasterDB <sup>53</sup>.

The distribution of RelA peaks across alternative and constitutive exons, and the average distance between RelA peaks and TAX exon targets was measured using ChIP-seq datasets from GEO <sup>58</sup>, ENCODE <sup>59</sup> and CISTROME <sup>60</sup> databases: from GEO GSE63736, GSM1239484, GSM486271, GSM486293, GSM486298, GSM486318, GSM847876, GSM847877, GSM2394419, GSM2394421, GSM2394423, from ENCODE ENCF002CPA, ENCF002CQB, ENCF002CQJ, ENCF002CQN, ENCF580QGA and from CISTROME 53597, 5388, 5389, 4940, 36310, 36316, 4971. For another GEO dataset, GSM2628088, reads were mapped to the hg19 build of the human genome with Bowtie2 <sup>61</sup> and RelA peaks were identified with Macs2 <sup>62</sup>. Alternative and Constitutive spliced exons were obtained from FasterDB <sup>53</sup>. In order to focus on intragenic RelA peaks, we used the bedtools <sup>63</sup> intersect command to remove all intergenic RelA peaks and all RelA peaks localized on first exon (or at least at less than 500nt) for each gene. A Perl script was specifically created to measure the distance between RelA peaks and TAX-regulated exons. Briefly, RelA peaks and exons are provided as BED files and the script reports for each exon the distance in nucleotides of the nearest RelA peak. Closest peak distances from the 710 TAX-regulated exon-cassettes were compared to closest peak distances from 710 exons chosen by chance ( $10^5$ runs).

#### *TALE design and construct*

The TALE constructs were obtained from ThermoFisher Scientific. TALEs were constructed using the Golden Gate Assembly method as previously described <sup>38</sup>. The RVDs HD, NI, NG and NN were chosen to specifically recognize the nucleotides C, A, T and G, respectively. The TALE

targeting *CD44* v10 sequence was 5' TCCAACCTAATGTCAATC 3'. This TALE construct was fused to a V5 sequence and a SV40 NLS at its 5' end and cloned in the NotI-HindIII fragment of the pXJ41 backbone plasmid. DDX17-WT and DDX17-K142R cDNA were obtained by PCR from pcDNA3-HA-DDX17 and pcDNA3-HA-DDX17-K142R and were cloned in the HindIII-BglII fragment in the MCS downstream to the TALE sequence. The *RELA* cDNA was amplified from a library of cDNA of 293T-LTR-GFP cells and was cloned in the HindIII-BamHI fragment.

#### *CRISPR design and construct*

The sequence-specific sgRNA for site-specific interference of genomic targets were designed using CRISPRseek R package (Zhu et al., 2014), and sequences were selected to minimize off-target effect<sup>64</sup>. Two complementary oligonucleotides were annealed and cloned into BbsI site of pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene plasmid #62988) for co-expression with Cas9 using 5U of T4 DNA ligase, T4 DNA ligase buffer (1X) (Roche). 293T-LTR-GFP cells were transfected with the mix of equimolar ratio of PX459-sgRNA1 and PX459-sgRNA2 (Table S4). At 24h post-transfection, the medium was changed and 1µg/ml puromycin was added for selection and cells were cloned by serial dilution method.

#### **ACCESSION NUMBERS**

The RNA-Seq data have been deposited on NCBI GEO under the accession number GSE123752.

## Discussion et Perspectives

## Tax impacte l'épissage alternatif des gènes cellulaires

Nous démontrons ici pour la première fois que l'oncoprotéine Tax régule l'épissage alternatif des gènes cellulaires. Ces résultats permettent pour partie d'expliquer les altérations d'épissage alternatif observées précédemment dans les cellules infectées *in vivo* chez les patients atteints de TSP/HAM et d'ATLL (Thénoz et al., 2014). Pour la majorité des événements d'épissage reliés à Tax, les mécanismes font intervenir l'hélicase à ARN DDX17 qui est recrutée à la chromatine à proximité des exons régulés par la sous-unité RelA de NF- $\kappa$ B. Par cette action, RelA fournit à DDX17 une spécificité de cible d'épissage propre à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ces évènements s'opèrent indépendamment des effets de Tax et de NF- $\kappa$ B sur les niveaux d'expression des gènes. Seuls 3% (33/939) des gènes modifiés en épissage par Tax sont retrouvés dérégulés quantitativement dans leur niveau d'expression. Les transcrits alternativement épissés sont impliqués dans des voies fonctionnelles différentes de celles modulées par les transcrits modulés quantitativement. Ces résultats révèlent un nouveau mécanisme de contrôle de l'expression des gènes par Tax qui pourrait contribuer à son pouvoir oncogène. De façon intéressante, ces dérégulations d'épissage sont également retrouvées dans les cellules de patients atteints d'ATL (Kataoka et al., 2015). Bien que Tax soit rarement exprimée dans les cellules tumorales, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B reste constitutive et peut expliquer la conservation des modifications d'épissage reliées à Tax dans ces cellules.

Cependant, une étude récente utilisant un système d'expression de la d2GFP sous le contrôle de 18 copies d'élément de réponse à Tax montre qu'il existe une expression transitoire de Tax dans les cellules de lignées dérivées de patients ATL (Mahgoub et al., 2018). Celle-ci semble être au dépend de l'expression d'HBZ. Par ailleurs, les auteurs démontrent également que l'inhibition de l'expression de Tax dans les cellules MT-1 induit l'entrée en apoptose de ces cellules, suggérant que le maintien de l'expression de Tax au stade ATL serait indispensable à la survie tumorale. Dans un tel contexte, les réactivations répétées de la voie canonique de NF- $\kappa$ B par les « burst » d'expression Tax pourraient expliquer la conservation des évènements d'épissage alternatif liés à Tax dans les ATL.

### Impacts fonctionnels des régulations de l'épissage alternatif par Tax

L'analyse de l'ontologie des gènes régulés au niveau de l'épissage par Tax révèle que le top 5 des voies affectées concerne les relations structures/fonctions de la membrane cellulaire, incluant le métabolisme du phosphatidylinositol et sa voie d'activation, le transport vésiculaire, les ABC transporter, et l'adhésion cellulaire. Nos résultats montrent en particulier que l'inclusion de l'exon v10 dans les transcrits *CD44* des cellules exprimant Tax s'accompagne d'un changement d'affinité de substrat d'adhésion des cellules qui se traduit par une perte d'adhésion à l'acide hyaluronique et un gain affinité pour le collagène IV. Ces résultats sont en adéquation avec les propriétés de la glycoprotéine CD44v10 (Weimann et al., 2001). De façon intéressante, le collagène IV est un composant majeur de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Xu et al., 2019). Les modifications d'épissage de *CD44* par Tax pourraient donc participer à modifier le tropisme des cellules T-CD4+ et favoriser leur adhésion à la BHE et contribuer à l'invasion du système nerveux central par les cellules infectées. Supportant cette hypothèse, les niveaux d'expression du variant CD44v10 dans le sang des patients atteints de TSP/HAM sont plus élevés que chez les donneurs (Matsuoka et al., 2000). Ce mécanisme pourrait être complémentaire des modifications d'expression des molécules d'adhésion déjà montrées dans le contexte de l'infection, tels que la L-sélectine et Gem qui favorisent respectivement l'adhésion aux cellules endothéliales (HUVEC) et la migration des cellules infectées (Tatewaki et al., 1995)(Chevalier et al., 2014). Au total, nos données de RNA-seq indiquent que 18 gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire sont modulés dans leur épissage par Tax. L'étude des domaines codés par ces exons régulés pourrait permettre de préciser les mécanismes de modifications des propriétés d'adhésion générés par Tax dans les cellules infectées.

### La sous unité NF- $\kappa$ B RelA régule l'épissage alternatif

Dans le cadre de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, les analyses à large échelle de la distribution chromatinienne de la sous-unité RelA montrent que les régions ciblées par ce facteur sont pour l'essentiel des régions exoniques et introniques (Borghini et al., 2018; Lim et al., 2007b; Martone et al., 2003; Zhao et al., 2014). Nos données décrivent ici pour la première fois l'impact fonctionnel de cet enrichissement intragénique de RelA sur la régulation de l'épissage alternatif. Ainsi, outre la régulation quantitative de l'expression des gènes, RelA via DDX17

régule également la diversité du transcriptome en réponse à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons observé que certaines de ses modifications, tel que l'inclusion de v10 dans les transcrits *CD44*, sont générées par l'exposition des cellules au TNF- $\alpha$  (non-montré), indiquant que ce processus repose vraisemblablement sur un mécanisme physiologique que Tax exacerbe en activant constitutivement la voie NF- $\kappa$ B. Ces données suggèrent que la modification d'un transcriptome, aussi immédiate que celle liée à la voie NF- $\kappa$ B, peut s'organiser autour un seul et même effecteur, RelA, présentant des facettes fonctionnelles multiples, telles que la régulation de la transcription et de l'épissage alternatif. Il serait intéressant d'étudier les possibilités de régulation de l'épissage alternatif par d'autres effecteurs transcriptionnels des voies de signalisation cellulaires fréquemment retrouvées dérégulées au cours de l'infection, comme dans d'autres cancers, telles que les voies MAPK, JAK-STAT et AKT.

Le groupe de Benjamin J. Blencowe a mis en évidence par des expériences de SPAR-Seq le rôle d'autres facteurs de régulation de la transcription et de la chromatine, tels que Zfp871 et Nacc1, dans la régulation de l'épissage alternatif (Han et al., 2017). Ces facteurs ont la capacité de fixer l'ARN à des régions adjacentes aux exons cibles, et contrôlent également l'expression des facteurs d'épissage impliqués dans leur régulation (Han et al., 2017). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax n'influence pas significativement l'expression des gènes codants les facteurs d'épissage. En revanche en ce qui concerne la capacité des facteurs NF- $\kappa$ B à fixer l'ARN, des études ont montré que RelA est capable d'interagir avec des ARNs long non codant qui régulent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B au niveau cytoplasmique (*NKILA*) comme au niveau nucléaire (*MALAT1*) en empêchant la fixation de p65/RelA au niveau de la chromatine (Liu et al., 2015; Mao et al., 2016). L'utilisation de méthodologies de précipitation de l'ARN telles que RIP-seq et CLIP-seq permettrait de tester les capacités de RelA à fixer les ARN en cours de synthèse et, d'autre part d'identifier s'il existe des sites consensus de reconnaissance de ces ARN. Par ailleurs, il serait intéressant d'identifier si les domaines de fixation à l'ARN de *RELA* sont distincts de ceux engagés dans la fixation de l'ADN, ainsi il serait possible de découpler par mutagenèse dirigée les fonctions de RelA liées à la fixation de l'ARN et de l'ADN et de mieux caractériser leurs rôles respectifs dans la réponse inflammatoire et/ou l'infection à HTLV-1.

## DDX17 est recruté à la chromatine au cœur des gènes pour réguler l'épissage alternatif

L'ARN hélicase DDX17 possède des fonctions multiples dans le contrôle de l'expression des gènes. Outre ses fonctions de déroulement des structures secondaires ARN, qui ont été montrées indispensables à la régulation de l'épissage alternatif (Hönig et al., 2002b), DDX17 est retrouvée recrutée à la chromatine au niveau de promoteurs où elle contrôle l'activité transcriptionnelle des gènes (Alqahtani et al., 2016; Dardenne et al., 2014). Nos résultats montrent que le recrutement à la chromatine de DDX17 s'opère également au sein des gènes où elle contrôle l'épissage. Le rôle de DDX17 à la chromatine reste encore mal compris. Une des fonctions de ces hélicases serait notamment de stabiliser le complexe de pré-initiation transcriptionnelle à la chromatine (Lambert et al., 2018; Yao et al., 2010). Nos données vont dans ce sens car nous avons pu observer que la déplétion des facteurs DDX5/17 par siRNA aboutit à la perte de RelA à la chromatine des exons régulés. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que DDX5/17 puissent être important pour l'import nucléaire de RelA comme suggéré par une étude réalisée dans des cellules de glioblastomes (Wang et al., 2012).

Les hélicases DDX5/17 ont été montrées en interaction avec d'autres facteurs de transcription, tels que c-myc et p53, dont la distribution chromatinienne concerne également majoritairement des régions intragéniques (Cawley et al., 2004). Il serait intéressant d'étudier si, comme RelA, ces facteurs peuvent jouer un rôle d'ancre chromatinienne pour des facteurs d'épissage et définir des profils d'épissage alternatif propres à leur fonctions pro- ou anti-apoptotiques.

## Rôle de RelA dans le contrôle de la topologie de la chromatine et la régulation de l'épissage alternatif

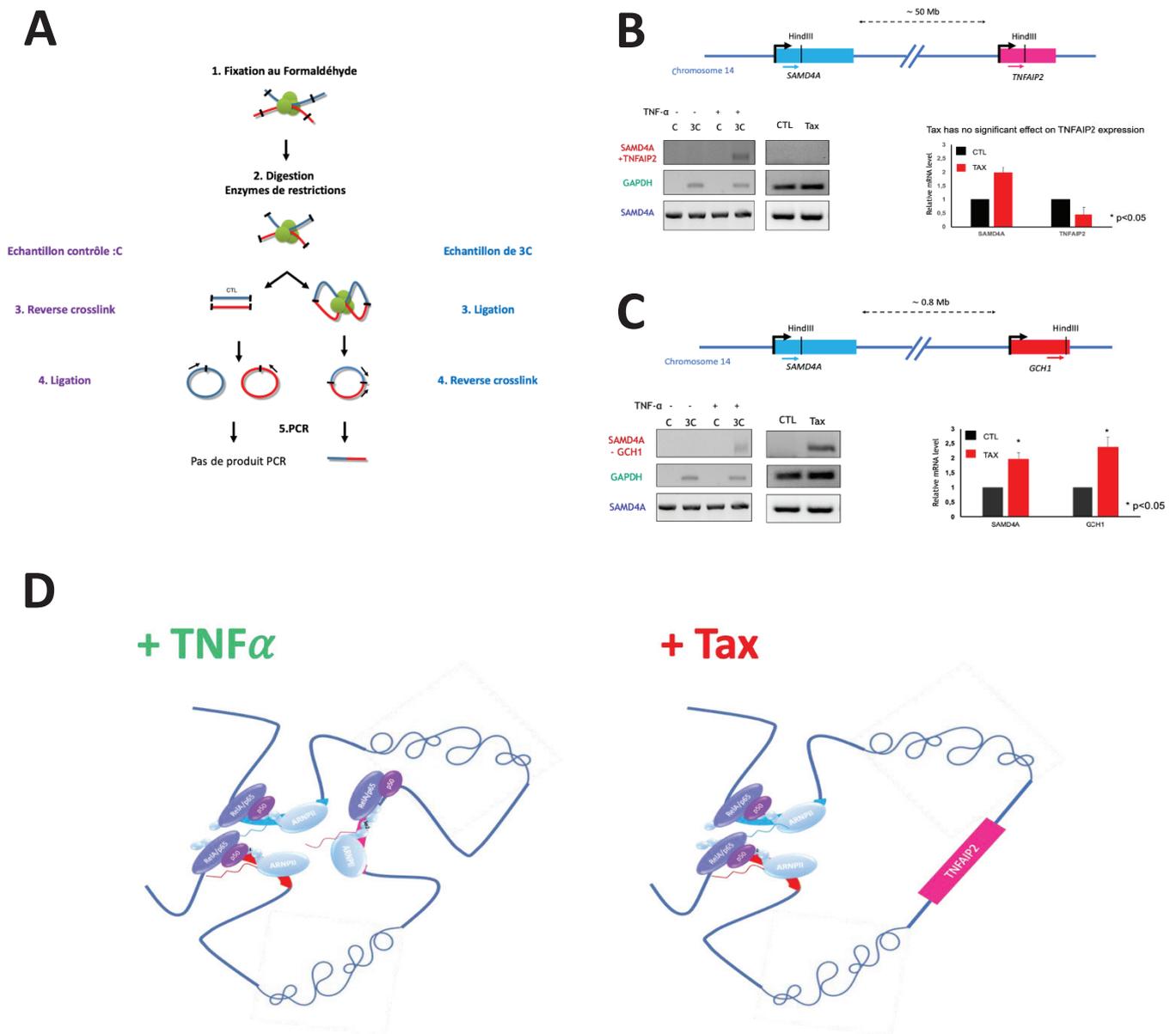
L'étude de la distribution du facteur NF- $\kappa$ B RelA au cours de l'activation chronique peut être étudiée sous différents angles. Jusqu'à présent nous avons abordé la question de la distribution de RelA sans prendre en compte l'organisation tridimensionnelle de la chromatine (3D). En effet, il a été montré que l'organisation tridimensionnelle de la chromatine dans des cellules endothéliales primaires HUVEC pouvait expliquer en partie la distribution du facteur NF- $\kappa$ B (Kolovos et al., 2016). Il est aujourd'hui bien établi que l'organisation de la chromatine dans l'espace nucléaire influence l'expression des gènes (Bertero et al., 2019; Fanucchi et al., 2013; Papantonis et al., 2012). Le développement des technologies de Chromosome Conformation Capture (3C) et d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) a permis de démontrer que des gènes coordonnés dans leur transcription pouvaient être retrouvés au sein de structures transcriptionnellement actives appelées usines à transcription, ou factories. L'activation de la transcription de gènes par le TNF $\alpha$  induit la formation d'une usine à transcription spécialisée, appelée NF- $\kappa$ B factory, au sein de laquelle des gènes sont regroupés et activés par les facteurs NF- $\kappa$ B (Papantonis et al., 2012). Plus précisément, 10 minutes après une stimulation au TNF $\alpha$ , les promoteurs des gènes situés sur le chromosome 14 (*SAMD4A* et *TNFAIP2*) et un sur le chromosome 11 (*SLC6A5*) s'associent de manière séquentielle pour former un complexe multigénique dépendant de NF- $\kappa$ B (Papantonis et al., 2010). L'analyse intégrative des expériences de 3C, RNA FISH et TALEN (TALE Nucléase) démontre que la formation de ces NF- $\kappa$ B factories est associée à la coordination de la régulation transcriptionnelle de *SAMD4A*, *TNFAIP2* et *SLC6A5* (Fanucchi et al., 2013; Papantonis et al., 2010).

Ces données obtenues dans un modèle d'activation physiologique de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  posent la question du rôle de la topologie de la chromatine dépendante de NF- $\kappa$ B dans un contexte pathologique d'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax.

Grâce à des approches de 3C, nous avons étudié les effets de l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax sur l'apparition des contacts entre les gènes de réponse à NF- $\kappa$ B. Pour cela, nous avons comparé l'apparition des contacts chromatiniens liées à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans le contexte physiologique (TNF- $\alpha$ ) et un contexte d'activation chronique lié à Tax.

Nos données préliminaires indiquent que sous l'expression de Tax les contacts chromatiniens entre *SAMD4A* et *GCH1* augmentent et s'accompagnent d'une activation transcriptionnelle des 2 gènes dans les cellules HEK293T (**Figure 39**), ce qui pourrait suggérer la mise en place de NF- $\kappa$ B factories décrites pour ces gènes lors de l'activation physiologique par TNF- $\alpha$ . En revanche, Tax semble incapable d'induire des contacts entre *SAMD4A* et *TNFAIP2* et d'activer l'expression de *TNFAIP2*, comme décrit sous TNF- $\alpha$  (Fanucchi et al., 2013; Papantonis et al., 2010). Ces données préliminaires suggèrent que l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B par Tax aboutit à des remaniements de la topologie de la chromatine et de l'expression des gènes distincts de ceux observés lors d'une activation physiologique.

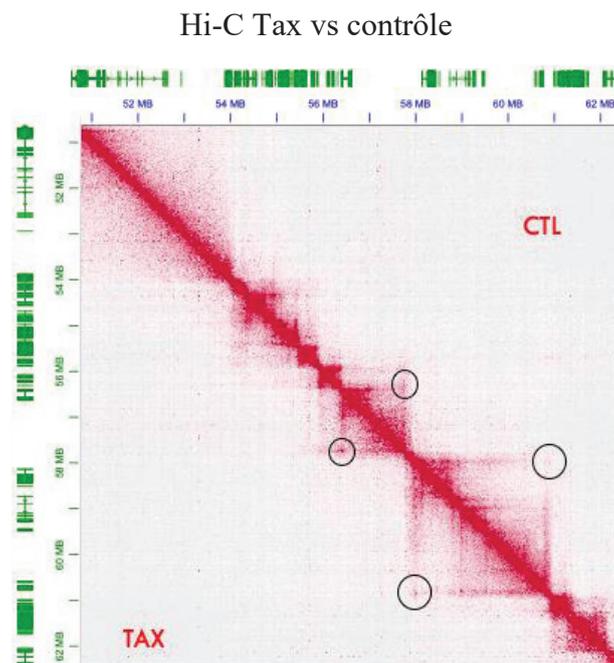
Nous avons pu mettre en évidence grâce à la technique de 3C que l'interaction connue entre *SAMD4A* et *GCH1* au sein de la NF- $\kappa$ B factory en condition physiologique d'activation n'était pas induite lors d'une activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax. Afin de mettre en évidence l'impact de l'activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax sur l'organisation tridimensionnelle de la chromatine de manière non biaisée et à large échelle, nous avons utilisé la technique de Hi-C.



**Figure 39 : L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax permet de former des NF- $\kappa$ B factories**

**A.** Étapes de la technologie 3C-PCR **B.** Détection d'un rapprochement spatial entre SAMD4A et GCH1 par la méthodologie 3C-PCR. Obtention d'un produit PCR (Interaction entre SAMD4A et GCH1) dans les conditions 3C lors de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B suite à une activation au TNF $\alpha$  et également en présence de Tax. La boucle intragénique GAPDH décrite par Papantonis et al., (2010) constitue un contrôle positif de 3C (**Figure Annexe 2**). Les amorces de PCR pour le contrôle de charge d'ADN sont situées entre les deux sites HindIII (SAMD4A) (**Figure Annexe 2**). Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes SAMD4A et GCH1 dans des cellules exprimant ou non Tax. **C.** Interaction entre SAMD4A et TNFAIP2. Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes SAMD4A et TNFAIP2 dans des cellules exprimant ou non Tax. **D.** Modèle 3D proposé : L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tax ne permet pas le rapprochement entre SAMD4A, GCH1 et TNFAIP2 contrairement au TNF $\alpha$ .

Nos données de Hi-C Tax vs Contrôle suggèrent que l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B est impliquée dans l'organisation 3D de la chromatine (**Figure 40**). La résolution de ces expériences préliminaires de Hi-C n'était pas suffisante (40 kb) pour caractériser les interactions de type intragéniques, il serait donc nécessaire de valider les contacts capturés par Hi-C par la technologie de 3C pour ainsi établir et choisir un set de gènes candidats. Des expériences de 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) sur les gènes cibles choisis devront ensuite pouvoir affiner la cartographie des contacts gène à gène (**Figure Annexe 3**). Les techniques disponibles au laboratoire basées sur l'utilisation de la protéine Cas9 visant à modifier la structure 3D (CLOuD9) ou à moduler la transcription (activation par Cas9-VPR ou répression par Cas9-KRAB) constituent des outils primordiaux afin d'affiner les potentiels mécanismes de couplages entre la transcription et l'épissage des gènes sous l'effet de l'oncogène Tax (**Figure Annexe 3**).

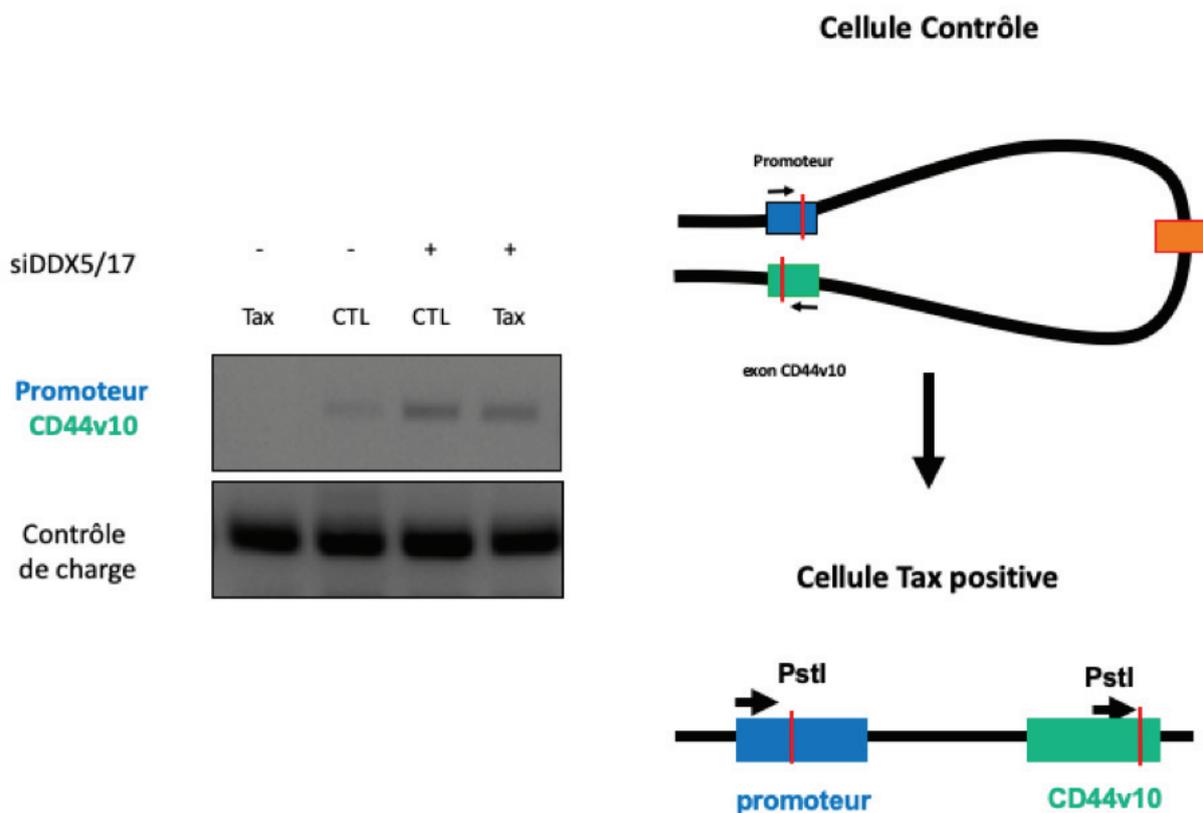


**Figure 40 : L'expression de l'oncoprotéine Tax module l'organisation tridimensionnelle de chromatine.**

Exemple de contact inter-chromosomique modulé par Tax (cercles noirs) mis en évidence par la technique de Hi-C.

Dans ce contexte, nous avons recherché par 3C si les contacts chromatinienés générés par RelA pouvaient participer à la régulation de l'épissage alternatif. Mercer *et al.*, ont déjà montré que les exons alternatifs sont plus souvent retrouvés à proximité de leur promoteur, suggérant un rôle de l'organisation 3D dans la régulation de l'épissage alternatif (Mercer *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, comme RelA a été identifié comme un acteur dans les contacts 3D gène-à-gène (Fanucchi *et al.*, 2013; Papantonis *et al.*, 2010, 2012) et que les ARN hélicases DDX5 et DDX17 ont été récemment associées au maintien des boucles de chromatines (Morgan *et al.*, 2017), nous avons recherché si les régulations d'épissage des transcrits du gène *CD44* liés à RelA et DDX17 sous l'expression de Tax engagent des modifications de la topologie de l'ADN. Nos résultats préliminaires suggèrent que, sous l'expression de Tax, l'enrichissement chromatinien de RelA et de DDX17 au niveau de l'exon v10 réduit la fréquence des contacts chromatinienés entre l'exon v10 et le promoteur de *CD44* (**Figure 41**). L'ouverture de cette boucle chromatinienne semble être dépendante de l'expression de DDX5/17 (**Figure 41**) et coïncide avec une augmentation de l'inclusion de l'exon variable v10 du gène *CD44* (non montré). Ces essais doivent être répétés pour valider nos résultats. Il serait également intéressant d'utiliser la stratégie CLOuD9 dérivée du CRISPR/Cas9 (Morgan *et al.*, 2017) qui permettrait de forcer le rapprochement de l'exon v10 du promoteur *CD44* en présence de Tax et d'établir s'il existe un lien direct et causal entre l'organisation tridimensionnelle de la chromatine et la régulation de l'épissage alternatif.

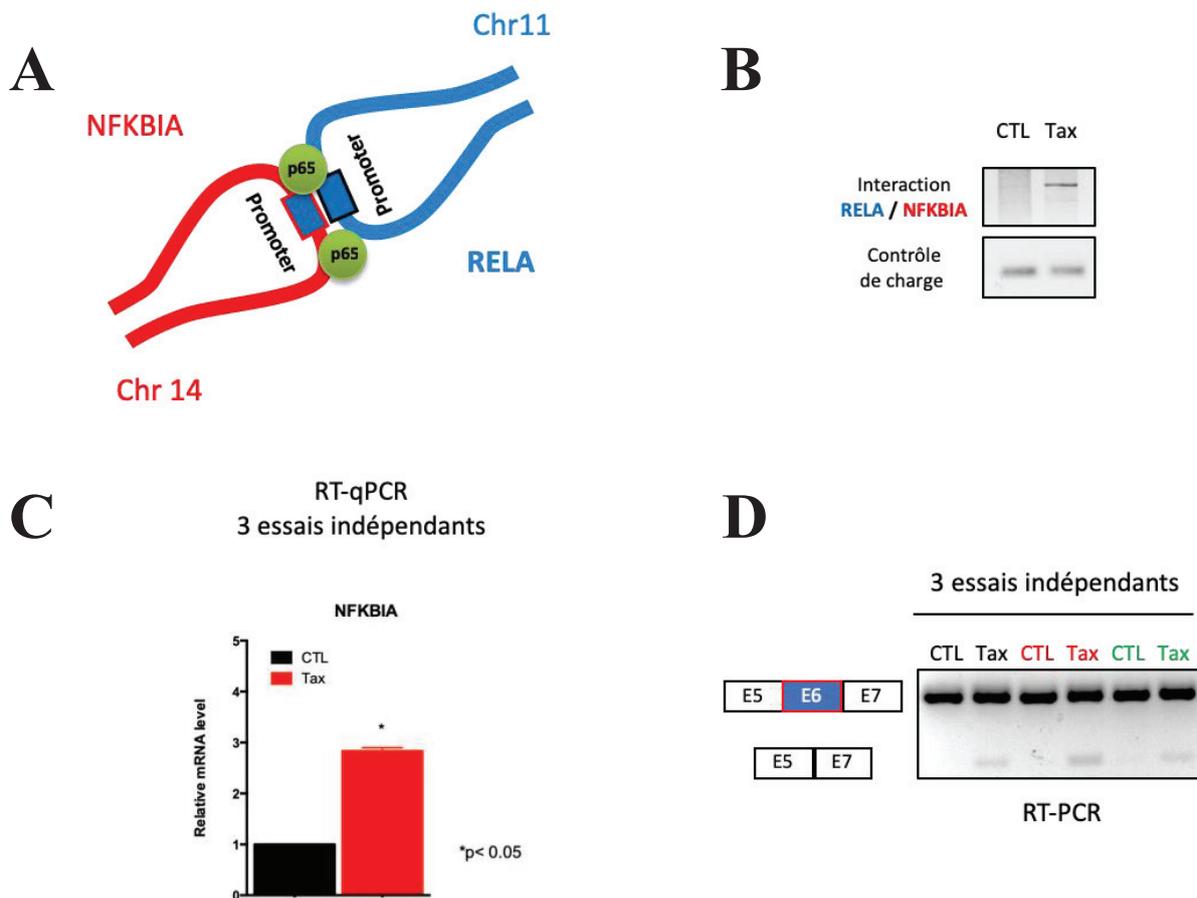


**Figure 41 : L'activation de la voie NF- $\kappa$ B médiée par Tax empêche la rencontre entre l'exon CD44v10 et son promoteur**

Rapprochement spatial entre le promoteur du gène *CD44* et l'exon CD44v10 révélé par 3C-PCR. Le contrôle de charge est désigné entre deux sites PstI.

Dans ce contexte, il a été récemment montré l'existence d'usines à épissage, enrichies par les facteurs d'épissage RBM20, qui sont associées à la co-régulation de la transcription et de l'épissage des gènes *TTN*, *CACNA1C* et *CAMK2D* (Bertero et al., 2019). Ces données sont en accord avec un travail récent de Nojima *et al.* qui démontre que le spliceosome est retrouvé associé aux sérines 5 phosphorylées de l'ARNPII (Nojima et al., 2018). Parmi les gènes en contact dans les cellules exprimant Tax, nous avons détecté un rapprochement entre les promoteurs des gènes *RELA* et *NFKBIA*, codant respectivement p65/RelA, acteur majeur de la voie canonique NF- $\kappa$ B, et le facteur I $\kappa$ B $\alpha$ , responsable de la séquestration cytoplasmique de p65/RelA et inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B. De façon intéressante, ces contacts chromatinien coïncident avec une augmentation de la transcription du gène *NFKBIA* et une exclusion de l'exon variable 6 de *RELA* codant pour un domaine fonctionnel d'interaction protéine-protéine

et de fixation à l'ADN (Figure 42). Ces effets ne semblent pas être retrouvés sous l'activation par le TNF- $\alpha$  de la voie NF- $\kappa$ B (non montré). Ces résultats suggèrent que la réorganisation des contacts gène-à-gène par Tax pourrait perturber la transcription mais également l'épissage alternatif. Les analyses futures devront confirmer ces données et disséquer les mécanismes et l'impact fonctionnel de la rencontre de ces 2 gènes *NFKBIA* et *RELA* sur le contrôle de la voie NF- $\kappa$ B et les processus leucémogènes liés à Tax.



**Figure 42 : Tax induit la formation du complexe NFKBIA et RELA qui permet leur co-régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle**

**A.** Interaction spatiale entre les gènes *NFKBIA* et *RelA* induite par Tax. **B** Interaction entre *NFKBIA* et *RELA* détectée par 3C-PCR. Le contrôle de charge est désigné entre deux sites PstI **C.** Quantification par RT-qPCR de l'expression du gène *NFKBIA* dans des cellules exprimant ou non Tax. **D.** RT-PCR exon spécifique des exons 5 et 7 du gène *RelA*.

# Conclusion générale

Mes travaux de thèse montrent pour la première fois que, outre ses effets sur la transcription, l'oncoprotéine Tax de HTLV-1 régule l'épissage alternatif de nombreux gènes cellulaires impliqués dans le contrôle de la prolifération et de l'adhésion des cellules. En conséquence, ces nouvelles propriétés de Tax pourraient contribuer à ces effets oncogènes. Par ailleurs, nous démontrons qu'une grande partie des modifications d'épissage reliées à Tax reposent sur la formation d'un complexe entre le facteur d'épissage DDX17 et le facteur transcriptionnel RelA. Ces données redéfinissent RelA, non plus comme un régulateur de la transcription des gènes cibles de la voie NF- $\kappa$ B, mais comme un régulateur de l'expression des gènes contrôlant à tous les niveaux, quantitatifs et qualitatifs, le transcriptome dans un contexte inflammatoire. Ces résultats s'inscrivent dans les travaux actuels revisitant la notion de régulateurs de l'expression des gènes, où des protéines initialement restreintes aux fonctions de contrôle de la transcription sont aujourd'hui retrouvées dans les mécanismes de maturation des ARN. Ce nouveau degré de complexité, notamment concernant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre les mécanismes qui gouvernent les pathologies inflammatoires et le développement tumoral associés à HTLV-1, mais également d'autres pathologies liées à l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B.

# ANNEXES

### 3C (Chromosome Conformation Capture) et HiC (highthroughput Chromosome conformation capture)

Le 3C a été réalisé comme décrit précédemment par Dekker et al., (2002). La première étape nécessite la fixation de  $10^7$  cellules en utilisant du formaldéhyde (Thermo Scientific) à concentration finale 1% pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lysées 30 minutes sur glace (4°C). Les noyaux sont isolés puis resuspendus dans le tampon de digestion (1 X FastDigest buffer, Thermo Scientific) et incubés avec les enzymes de restriction choisies (HindIII et PstI FastDigest Thermo Scientific) pendant 16 heures à 37 °C. La ligation a été effectuée dans un volume final de 7 ml en utilisant 800 unités T4 ADN ligase (Roche). Ce mélange a été incubé pendant 16 heures à 16°C. Après une étape de reverse crosslink (16 heures à 65 °C), l'ADN a été purifié par extraction au phénol/chloroforme (**Figure Annexe1**).

L'ensemble des fragments linéaires d'ADN obtenus forme une librairie 3C contenant des séquences hybrides de tous les produits de ligation du génome des régions proches dans l'espace nucléaire in-vivo. Les bibliothèques 3C ont été analysées par PCR classique en plaçant des amorces au niveau des sites de restriction des deux fragments chromatiniens ciblés (**Figure Annexe1**). Les conditions de PCR ont été ajustées de manière à ce que les réactions se situent dans la phase d'amplification linéaire en utilisant le kit Herculase fusion II (Agilent).

Les bibliothèques Hi-C ont été générées comme décrit précédemment par (Lieberman-Aiden et al., 2009) et séquencées à la plateforme de Strasbourg.

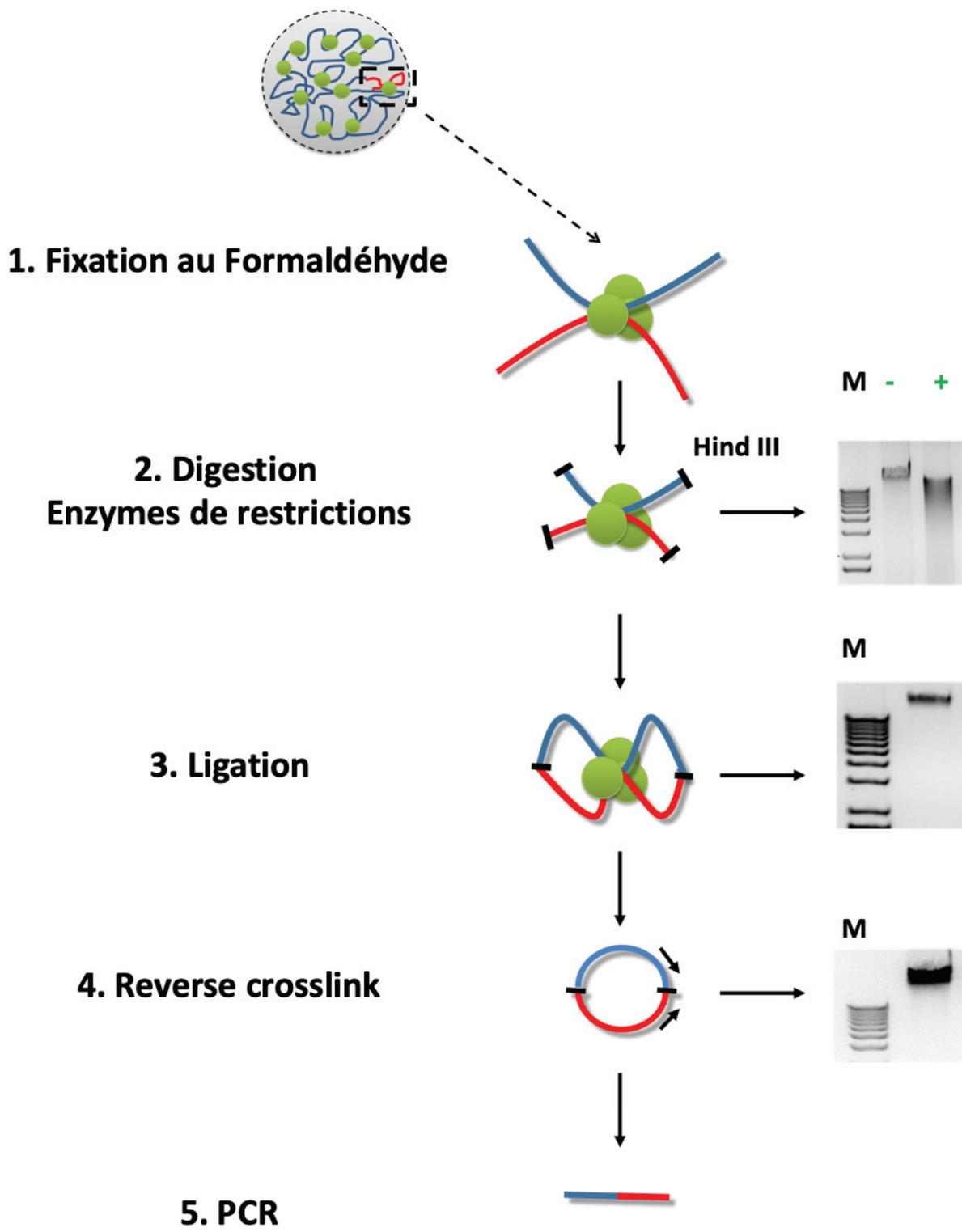
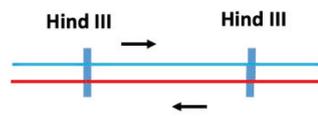
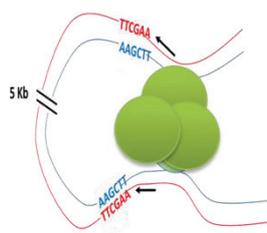


Figure Annexe 1 : Schéma de la technologie de Chromosome conformation capture 3C

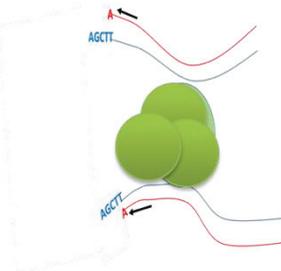
**Contrôle de charge  
gène *SAMD4A***



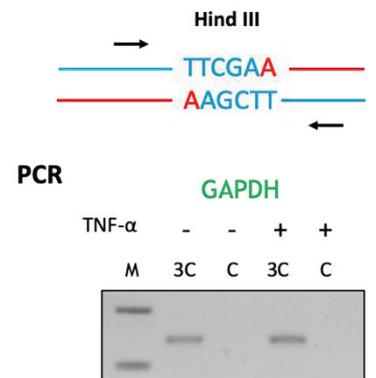
**Contrôle positif de boucle  
gène *GAPDH***



**Digestion par  
Hind III**



**Ligation**



**Figure Annexe 2 : Contrôles de 3C utilisés (Figure 1 partie Discussion et Perspectives)**

Figure Annexe 3 : Liste des techniques d'étude de la chromatine citées dans le manuscrit

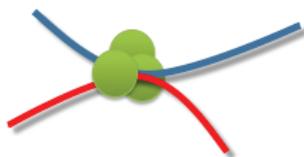
Techniques d'étude de la chromatine	
CRISPR/Cas9	Délétion d'une séquence d'ADN ciblé
TALEN	
dCas9 VPR	Induction ou augmentation de l'expression d'un gène cible
dCas9 KRAB	Répression de l'expression d'un gène cible
TALE	Recrutement d'un facteur d'intérêt sur une séquence d'ADN choisie
Cloud9	Technique dérivée du système CRISPR Recrutement de 2 dCas 9 (Aureus et Pyogenes) au niveau deux régions distinctes pour induire un rapprochement physique de manière ectopique entre 2 régions d'ADN ciblées

Techniques d'étude de l'ARN	
RNA-seq	Étude quantitative (expression des gènes) et qualitative (variants d'épissage alternatif) du transcriptome
RNA FISH	Technique de microscopie permettant la visualisation d'une ou de plusieurs séquences d'ARN d'intérêts
Clip-seq	Techniques permettant d'identifier les séquences d'ARN interagissant avec une ou plusieurs protéines d'intérêt
RIP	
SPAR-seq	Étude à large échelle des protéines régulant l'ARN (ici l'épissage alternatif)

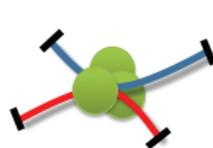
Techniques d'étude de l'ADN	
DNase seq	Identification des régions chromatiniennees ouvertes
MNase-seq	
ATAC-seq	
ChIP-seq	Techniques permettant d'identifier la ou les régions d'ADN interagissant avec les protéines d'intérêt
DNA FISH	Technique de microscopie permettant la visualisation d'une ou de plusieurs régions d'ADN d'intérêts

Techniques d'étude de l'organisation 3D de la chromatine « C »

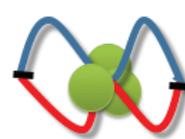
1. Fixation au formaldéhyde



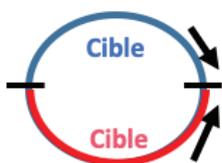
2. Digestion par des enzymes de restriction



3. Ligation

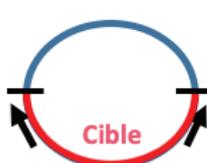


3C  
Cible vs. cible



= PCR

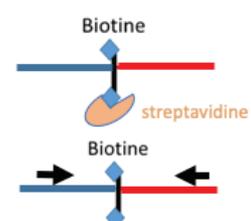
4C  
Cible vs. tous



= INVERSE PCR

Séquençage à haut débit

Hi-C  
Tous vs. tous



Séquençage à haut débit

# Bibliographie

- Alqahtani, H., Gopal, K., Gupta, N., Jung, K., Alshareef, A., Ye, X., Wu, F., Li, L., and Lai, R. (2016). DDX17 (P72), a Sox2 binding partner, promotes stem-like features conferred by Sox2 in a small cell population in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cell. Signal.* *28*, 42–50.
- Alvarez, C., Gotuzzo, E., Vandamme, A.-M., and Verdonck, K. (2016). Family Aggregation of Human T-Lymphotropic Virus 1-Associated Diseases: A Systematic Review. *Front. Microbiol.* *7*, 1674.
- Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J.-C., et al. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 998–1004.
- Amir, R.E., Haecker, H., Karin, M., and Ciechanover, A. (2004). Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene* *23*, 2540–2547.
- Andresen, V., Pise-Masison, C.A., Sinha-Datta, U., Bellon, M., Valeri, V., Washington Parks, R., Cecchinato, V., Fukumoto, R., Nicot, C., and Franchini, G. (2011). Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* *118*, 1549–1559.
- Anvar, S.Y., Allard, G., Tseng, E., Sheynkman, G.M., de Klerk, E., Vermaat, M., Yin, R.H., Johansson, H.E., Ariyurek, Y., den Dunnen, J.T., et al. (2018). Full-length mRNA sequencing uncovers a widespread coupling between transcription initiation and mRNA processing. *Genome Biol.* *19*, 46.
- Arnulf, B., Villemain, A., Nicot, C., Mordelet, E., Charneau, P., Kersual, J., Zermati, Y., Mauviel, A., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2002). Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* *100*, 4129–4138.
- Arun, G., Akhade, V.S., Donakonda, S., and Rao, M.R.S. (2012). mrhl RNA, a long noncoding RNA, negatively regulates Wnt signaling through its protein partner Ddx5/p68 in mouse spermatogonial cells. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3140–3152.
- Bai, X.T., and Nicot, C. (2012). Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Front. Microbiol.* *3*.
- Bandeira, L.M., Uehara, S.N.O., Asato, M.A., Aguenta, G.S., Maedo, C.M., Benites, N.H., Puga, M.A.M., Rezende, G.R., Finotti, C.M., Cesar, G.A., et al. (2015). High prevalence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants in non-endemic area of Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *9*, e0003691.
- Bangham, C.R.M. (2018). Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* *36*, 43–71.
- Bangham, C.R.M., Araujo, A., Yamano, Y., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15012.
- Batsché, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 22–29.
- Baydoun, H.H., Bai, X.T., Shelton, S., and Nicot, C. (2012). HTLV-I Tax Increases Genetic Instability by Inducing DNA Double Strand Breaks during DNA Replication and Switching Repair to NHEJ. *PLOS ONE* *7*, e42226.
- Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Carlos Ramos, J., Tortevoeye, P., Otroock, Z., Taylor, G., Gessain, A., Harrington, W., Panelatti, G., and Hermine, O. (2010). Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4177–

4183.

- Bentley, D.L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 163–175.
- Bertero, A., Fields, P.A., Ramani, V., Bonora, G., Yardimci, G.G., Reinecke, H., Pabon, L., Noble, W.S., Shendure, J., and Murry, C.E. (2019). Dynamics of genome reorganization during human cardiogenesis reveal an RBM20-dependent splicing factory. *Nat. Commun.* *10*.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., and Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* *71*, 3484–3497.
- Billman, M.R., Rueda, D., and Bangham, C.R.M. (2017). Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1. *Wellcome Open Res.* *2*, 87.
- Boekhoudt, G.H., Guo, Z., Beresford, G.W., and Boss, J.M. (2003). Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4139–4147.
- Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M., Knezevich, A., Pradet-Balade, B., Bäcker, V., Kornblihtt, A., Marcello, A., and Bertrand, E. (2007). The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. *J. Cell Biol.* *179*, 291–304.
- Bonnet, A., Randrianarison-Huetz, V., Nzounza, P., Nedelec, M., Chazal, M., Waast, L., Pene, S., Bazarbachi, A., Mahieux, R., Bénit, L., et al. (2012). Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* *9*, 77.
- Borghini, L., Lu, J., Hibberd, M., and Davila, S. (2018). Variation in Genome-Wide NF-κB RELA Binding Sites upon Microbial Stimuli and Identification of a Virus Response Profile. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *201*, 1295–1305.
- Bosisio, D., Marazzi, I., Agresti, A., Shimizu, N., Bianchi, M.E., and Natoli, G. (2006). A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity. *EMBO J.* *25*, 798–810.
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* *5*, 76.
- Bradl, M., Bauer, J., Flügel, A., Wekerle, H., and Lassmann, H. (2005). Complementary contribution of CD4 and CD8 T lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord. *Am. J. Pathol.* *166*, 1441–1450.
- Brauweiler, A., Garrus, J.E., Reed, J.C., and Nyborg, J.K. (1997). Repression of Bax Gene Expression by the HTLV-I Tax Protein: Implications for Suppression of Apoptosis in Virally Infected Cells. *Virology* *231*, 135–140.
- Brown, J.D., Lin, C.Y., Duan, Q., Griffin, G., Federation, A., Paranal, R.M., Bair, S., Newton, G., Lichtman, A., Kung, A., et al. (2014). NF-κB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol. Cell* *56*, 219–231.
- Camats, M., Guil, S., Kokolo, M., and Bach-Elias, M. (2008). P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PloS One* *3*, e2926.
- Caretti, G., Schiltz, R.L., Dilworth, F.J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F.V., Hoffman, E.P., Tapscott, S.J., and Sartorelli, V. (2006a). The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev. Cell* *11*, 547–560.
- Caretti, G., Schiltz, R.L., Dilworth, F.J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F.V., Hoffman, E.P., Tapscott, S.J., and Sartorelli, V. (2006b). The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev. Cell* *11*, 547–560.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni,

A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., et al. (2004). Unbiased Mapping of Transcription Factor Binding Sites along Human Chromosomes 21 and 22 Points to Widespread Regulation of Noncoding RNAs. *Cell* *116*, 499–509.

Chaib-Mezrag, H., Lemaçon, D., Fontaine, H., Bellon, M., Bai, X.T., Drac, M., Coquelle, A., and Nicot, C. (2014). Tax impairs DNA replication forks and increases DNA breaks in specific oncogenic genome regions. *Mol. Cancer* *13*, 205.

Chebel, A., Bauwens, S., Gerland, L.-M., Belleville, A., Urbanowicz, I., de Climens, A.R., Tourneur, Y., Chien, W.W., Catallo, R., Salles, G., et al. (2009). Telomere uncapping during in vitro T-lymphocyte senescence. *Aging Cell* *8*, 52–64.

Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q., and Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA. *Nature* *391*, 410–413.

Chen, L., Liu, D., Zhang, Y., Zhang, H., and Cheng, H. (2015). The autophagy molecule Beclin 1 maintains persistent activity of NF- $\kappa$ B and Stat3 in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *465*, 739–745.

Cherian, M.A., Baydoun, H.H., Al-Saleem, J., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Green, P., and Ratner, L. (2015). Akt Pathway Activation by Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein. *J. Biol. Chem.* *290*, 26270–26281.

Chevalier, S.A., Durand, S., Dasgupta, A., Radonovich, M., Cimarelli, A., Brady, J.N., Mahieux, R., and Pise-Masison, C.A. (2012). The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS One* *7*, e41003.

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 Pathog.* *10*, e1003917.

Ching, Y.-P., Chan, S.-F., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat. Cell Biol.* *8*, 717–724.

Cho, W.-K., Zhou, M., Jang, M.K., Huang, K., Jeong, S.-J., Ozato, K., and Brady, J.N. (2007). Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *J. Virol.* *81*, 11179–11186.

Chodavarapu, R.K., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., Hetzel, J.A., Kuo, F., Kim, J., Cokus, S.J., et al. (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* *466*, 388–392.

Clark, E.L., Coulson, A., Dalgliesh, C., Rajan, P., Nicol, S.M., Fleming, S., Heer, R., Gaughan, L., Leung, H.Y., Elliott, D.J., et al. (2008). The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* *68*, 7938–7946.

Clerc, I., Polakowski, N., André-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Lemasson, I. (2008). An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J. Biol. Chem.* *283*, 23903–23913.

Cook, L.B., Rowan, A.G., Melamed, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* *120*, 3488–3490.

Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., and Bangham, C.R.M. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *123*, 3925–3931.

Coulter, D.E., and Greenleaf, A. A Mutation in the Largest Subunit of RNA Polymerase II

Alters RNA Chain Elongation in Vitro. 9.

Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E., and Kornblihtt, A.R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11456–11460.

Cramer, P., Cáceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A.F., Baralle, F.E., and Kornblihtt, A.R. (1999). Coupling of Transcription with Alternative Splicing: RNA Pol II Promoters Modulate SF2/ASF and 9G8 Effects on an Exonic Splicing Enhancer. *Mol. Cell* 4, 251–258.

Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H., Zonta, E., Mortada, H., Gratadou, L., Deygas, M., et al. (2014). RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep.* 7, 1900–1913.

Das, M., Renganathan, A., Dighe, S.N., Bhaduri, U., Shettar, A., Mukherjee, G., Kondaiah, P., and Satyanarayana Rao, M.R. (2018). DDX5/p68 associated lncRNA LOC284454 is differentially expressed in human cancers and modulates gene expression. *RNA Biol.* 15, 214–230.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* 39, 373–384.

Dittmer, J., Pise-Masison, C.A., Clemens, K.E., Choi, K.S., and Brady, J.N. (1997). Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHrP P2 promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 4953–4958.

Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* 416, 1–8.

Dujardin, G., Lafaille, C., de la Mata, M., Marasco, L.E., Muñoz, M.J., Le Jossic-Corcós, C., Corcos, L., and Kornblihtt, A.R. (2014). How slow RNA polymerase II elongation favors alternative exon skipping. *Mol. Cell* 54, 683–690.

Durkin, S.S., Guo, X., Fryrear, K.A., Mihaylova, V.T., Gupta, S.K., Belgnaoui, S.M., Haoudi, A., Kupfer, G.M., and Semmes, O.J. (2008). HTLV-1 Tax Oncoprotein Subverts the Cellular DNA Damage Response via Binding to DNA-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 36311–36320.

Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M.F., Buchmann, C., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses* 3, 861–885.

Einsiedel, L., Woodman, R.J., Flynn, M., Wilson, K., Cassar, O., and Gessain, A. (2016a). Human T-Lymphotropic Virus type 1 infection in an Indigenous Australian population: epidemiological insights from a hospital-based cohort study. *BMC Public Health* 16, 787.

Einsiedel, L.J., Pham, H., Woodman, R.J., Pepperill, C., and Taylor, K.A. (2016b). The prevalence and clinical associations of HTLV-1 infection in a remote Indigenous community. *Med. J. Aust.* 205, 305–309.

Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T.S., Shoresh, N., Ward, L.D., Epstein, C.B., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M., et al. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43–49.

Fanucchi, S., Shibayama, Y., Burd, S., Weinberg, M.S., and Mhlanga, M.M. (2013). Chromosomal Contact Permits Transcription between Coregulated Genes. *Cell* 155, 606–620.

Felber, B.K., Paskalis, H., Kleinman-Ewing, C., Wong-Staal, F., and Pavlakis, G.N. (1985). The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science* 229, 675–679.

Fiorini, F., Robin, J.-P., Kanaan, J., Borowiak, M., Croquette, V., Le Hir, H., Jalinot, P., and Mocquet, V. (2018). HTLV-1 Tax plugs and freezes UPF1 helicase leading to nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat. Commun.* 9, 431.

Fox, J.M., Mutalima, N., Molyneux, E., Carpenter, L.M., Taylor, G.P., Bland, M., Newton, R., and Martin, F. (2016). Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 amongst mothers and children in Malawi within the context of a systematic review and meta-analysis of HTLV seroprevalence in Africa. *Trop. Med. Int. Health* *21*, 312–324.

Freaney, J.E., Kim, R., Mandhana, R., and Horvath, C.M. (2013). Extensive cooperation of immune master regulators IRF3 and NFκB in RNA Pol II recruitment and pause release in human innate antiviral transcription. *Cell Rep.* *4*, 959–973.

Fujikawa, D., Yamagishi, M., Nakagawa, S., Kurokawa, N., Soejima, A., Kobayashi, S., Uchimar, K., Tanaka, Y., Nakano, K., and Watanabe, T. (2015). EZH2 dependent epigenetic landscape in adult T cell leukemia and Tax immortalized cells. *Retrovirology* *12*, O13.

Fujino, T., and Nagata, Y. (2000). HTLV-I transmission from mother to child. *J. Reprod. Immunol.* *47*, 197–206.

Fuller-Pace, F.V. (2013). The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 756–763.

Furuta, R., Yasunaga, J.-I., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J.-I., Koh, K.-R., et al. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog.* *13*, e1006722.

Futsch, N., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2017). HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses* *10*.

Gabet, A.-S., Mortreux, F., Charneau, P., Riou, P., Duc-Dodon, M., Wu, Y., Jeang, K.-T., and Wattel, E. (2003). Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* *22*, 3734–3741.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J. Virol.* *76*, 12813–12822.

Geißler, V., Altmeyer, S., Stein, B., Uhlmann-Schiffler, H., and Stahl, H. (2013). The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7875–7888.

Gelfman, S., Cohen, N., Yearim, A., and Ast, G. (2013). DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon–intron structure. *Genome Res.* *23*, 789–799.

Germann, S., Gratadou, L., Zonta, E., Dardenne, E., Gaudineau, B., Fougère, M., Samaan, S., Dutertre, M., Jauliac, S., and Auboeuf, D. (2012). Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene* *31*, 4536–4549.

Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* *3*, 388.

Gessain, A., and Mahieux, R. (2012). Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev. Neurol. (Paris)* *168*, 257–269.

Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de Thé, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 407–410.

Gessain, A., Cassar, O., Domanovic, D., and Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (2015). Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection.

Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., et al. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* *80*, 6844–6854.

Ghosh, G., Wang, V.Y.-F., Huang, D.-B., and Fusco, A. (2012). NF-κB regulation: lessons from structures. *Immunol. Rev.* *246*, 36–58.

Giam, C.Z., and Xu, Y.L. (1989). HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing cellular factors and cAMP responsive element. *J. Biol. Chem.* *264*, 15236–15241.

Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* *117*, 3113–3122.

Giraud, G., Terrone, S., and Bourgeois, C.F. (2018). Functions of DEAD box RNA helicases DDX5 and DDX17 in chromatin organization and transcriptional regulation. *BMB Rep.* *51*, 613–622.

Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* *23*, 577–589.

Gonzalez, I., Munita, R., Agirre, E., Dittmer, T.A., Gysling, K., Misteli, T., and Luco, R.F. (2015). A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 370–376.

Greenwald, W.W., Li, H., Benaglio, P., Jakubosky, D., Matsui, H., Schmitt, A., Selvaraj, S., D’Antonio, M., D’Antonio-Chronowska, A., Smith, E.N., et al. (2019). Subtle changes in chromatin loop contact propensity are associated with differential gene regulation and expression. *Nat. Commun.* *10*, 1054.

Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.

Gross, C., and Thoma-Kress, A.K. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* *8*, 74.

Grover, A., Houlden, H., Baker, M., Adamson, J., Lewis, J., Prihar, G., Pickering-Brown, S., Duff, K., and Hutton, M. (1999). 5’ splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *J. Biol. Chem.* *274*, 15134–15143.

Gunderson, F.Q., and Johnson, T.L. (2009). Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genet.* *5*, e1000682.

Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Sci STKE* *2006*, re13–re13.

Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K.-T., and Grassmann, R. (2002). Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3327–3338.

Han, H., Braunschweig, U., Gonatopoulos-Pournatzis, T., Weatheritt, R.J., Hirsch, C.L., Ha, K.C.H., Radovani, E., Nabeel-Shah, S., Sterne-Weiler, T., Wang, J., et al. (2017). Multilayered Control of Alternative Splicing Regulatory Networks by Transcription Factors. *Mol. Cell* *65*, 539–553.e7.

Han, J., Kim, D., and Morris, K.V. (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 12422–12427.

Harhaj, E.W., Good, L., Xiao, G., and Sun, S.C. (1999). Gene expression profiles in HTLV-1-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* *18*, 1341–1349.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* *18*, 2195–2224.

Heger, P., Rosorius, O., Hauber, J., and Stauber, R.H. (1999). Titration of cellular export factors, but not heteromultimerization, is the molecular mechanism of trans-dominant HTLV-1 rex mutants. *Oncogene* *18*, 4080–4090.

Hickey, W.F., Hsu, B.L., and Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 254–260.

Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M., and Seiki, M. (1988). Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* 7, 519–523.

Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., and Stamm, S. (2007). Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet.* 3, e204.

Hivin, P., Gaudray, G., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2004). Interaction between C/EBPbeta and Tax down-regulates human T-cell leukemia virus type I transcription. *Virology* 318, 556–565.

Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2009). Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science* 325, 626–628.

Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W., and Berget, S.M. (2002a). Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5698–5707.

Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W., and Berget, S.M. (2002b). Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5698–5707.

Hsin, J.-P., and Manley, J.L. (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* 26, 2119–2137.

Huang, T.T., and Miyamoto, S. (2001). Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4737–4747.

Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y., and Cheng, H. (2009). HTLV-1 Tax Is a Critical Lipid Raft Modulator That Hijacks IκB Kinases to the Microdomains for Persistent Activation of NF-κB. *J. Biol. Chem.* 284, 6208–6217.

Huang, Q., Niu, Z., Han, J., Liu, X., Lv, Z., Li, H., Yuan, L., Li, X., Sun, S., Wang, H., et al. (2017). HTLV-1 Tax upregulates early growth response protein 1 through nuclear factor-κB signaling. *Oncotarget* 8, 51123–51133.

Hug, N., Longman, D., and Cáceres, J.F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 44, 1483–1495.

Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299, 1713–1716.

Inaba, S., Okochi, K., Sato, H., Fukada, K., Kinukawa, N., Nakata, H., Kinjyo, K., Fujii, F., and Maeda, Y. (1999). Efficacy of donor screening for HTLV-I and the natural history of transfusion-transmitted infection. *Transfusion (Paris)* 39, 1104–1110.

Ishitsuka, K., and Tamura, K. (2014). Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet Oncol.* 15, e517-526.

Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T., and Nakamura, M. (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 20, 2055–2067.

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

Iwasaki, Y. (1993). Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 3, 1–10.

Izban, M.G., and Luse, D.S. (1991). Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* 5, 683–696.

Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., and Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* *12*, 1059–1065.

Jacobs, A.-M.F., Nicol, S.M., Hislop, R.G., Jaffray, E.G., Hay, R.T., and Fuller-Pace, F.V. (2007). SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene* *26*, 5866–5876.

Jeang, K.T., Widen, S.G., Semmes, O.J., and Wilson, S.H. (1990). HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* *247*, 1082–1084.

Jeffery, K.J., Usuku, K., Hall, S.E., Matsumoto, W., Taylor, G.P., Procter, J., Bunce, M., Ogg, G.S., Welsh, K.I., Weber, J.N., et al. (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3848–3853.

Jensen, E.D., Niu, L., Caretti, G., Nicol, S.M., Teplyuk, N., Stein, G.S., Sartorelli, V., Wijnen, A.J. van, Fuller-Pace, F.V., and Westendorf, J.J. (2008). p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* *103*, 1438–1451.

Jin, D.Y., Spencer, F., and Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* *93*, 81–91.

Jin, F., Li, Y., Dixon, J.R., Selvaraj, S., Ye, Z., Lee, A.Y., Yen, C.-A., Schmitt, A.D., Espinoza, C.A., and Ren, B. (2013). A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature* *503*, 290–294.

Johnson, C., Van Antwerp, D., and Hope, T.J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *EMBO J.* *18*, 6682–6693.

Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., and Ruscetti, F.W. (2005). Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J. Virol.* *79*, 12692–12702.

Jung, C., Mittler, G., Oswald, F., and Borggrefe, T. (2013). RNA helicase Ddx5 and the noncoding RNA SRA act as coactivators in the Notch signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 1180–1189.

Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430–435.

Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S., and Wu, J.Y. (2011). RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1812–1821.

Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraiishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J.-I., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* *47*, 1304–1315.

Kearns, J.D., Basak, S., Werner, S.L., Huang, C.S., and Hoffmann, A. (2006). IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J. Cell Biol.* *173*, 659–664.

Kehn, K., Fuente, C. de la, Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., Mahieux, R., Pumfery, A., Bottazzi, M.E., and Kashanchi, F. (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* *24*, 525–540.

Kibler, K.V., and Jeang, K.T. (2001). CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* *75*, 2161–2173.

Kirk, P.D.W., Huvet, M., Melamed, A., Maertens, G.N., and Bangham, C.R.M. (2016). Retroviruses integrate into a shared, non-palindromic DNA motif. *Nat. Microbiol.* *2*, 16212.

Kolovos, P., Georgomanolis, T., Koeflerle, A., Larkin, J.D., Brant, L., Nikolic, M., Gusmao, E.G., Zirkel, A., Knoch, T.A., van Ijcken, W.F., et al. (2016). Binding of nuclear factor kappaB to noncanonical consensus sites reveals its multimodal role during the early inflammatory response. *Genome Res.* *26*, 1478–1489.

- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25–33.
- Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of I $\kappa$ B kinase pathways. *EMBO Rep.* 6, 321–326.
- Kuhlmann, A.-S., Villaudy, J., Gazzolo, L., Castellazzi, M., Mesnard, J.-M., and Duc Dodon, M. (2007). HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4, 92.
- Kuo, Y.-L., and Giam, C.-Z. (2006). Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *EMBO J.* 25, 1741–1752.
- Kurita, D., Yasunaga, J., Tanaka, A., Mohamed, M., and Matsuoka, M. (2018). Dynamic Changes of Chromatin Structure and Transcriptome By Transient Expression of HTLV-1 Tax in ATL Cells. *Blood* 132, 4094–4094.
- de La Fuente, C., Deng, L., Santiago, F., Arce, L., Wang, L., and Kashanchi, F. (2000). Gene expression array of HTLV type 1-infected T cells: Up-regulation of transcription factors and cell cycle genes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1695–1700.
- Ladner, K.J., Caligiuri, M.A., and Guttridge, D.C. (2003). Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF- $\kappa$ B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J. Biol. Chem.* 278, 2294–2303.
- Lairmore, M.D., and Franchini, G. (2007). Human T-cell Leukemia Virus Types 1 and 2. *Fields Virol. Phila. Wolters Kluwer Health* 2, 2071–2105.
- Lambert, M.-P., Terrone, S., Giraud, G., Benoit-Pilven, C., Cluet, D., Combaret, V., Mortreux, F., Auboeuf, D., and Bourgeois, C.F. (2018). The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* 46, 7686–7700.
- Latham, J.A., and Dent, S.Y.R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1017–1024.
- Lavorgna, A., Matsuoka, M., and Harhaj, E.W. (2014). A Critical Role for IL-17RB Signaling in HTLV-1 Tax-Induced NF- $\kappa$ B Activation and T-Cell Transformation. *PLoS Pathog.* 10.
- Le Blanc, I., Grange, M.P., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Blot, V., Pique, C., and Dokh lar, M.C. (2001). HTLV-1 structural proteins. *Virus Res.* 78, 5–16.
- Lee, D.K., Kim, B.-C., Brady, J.N., Jeang, K.-T., and Kim, S.-J. (2002). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the association of Smad proteins with Smad-binding element. *J. Biol. Chem.* 277, 33766–33775.
- Lemasson, I., Lewis, M.R., Polakowski, N., Hivin, P., Cavanagh, M.-H., Th bault, S., Barbeau, B., Nyborg, J.K., and Mesnard, J.-M. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J. Virol.* 81, 1543–1553.
- Lemoine, F.J., Kao, S.-Y., and Marriott, S.J. (2000). Suppression of DNA Repair by HTLV Type 1 Tax Correlates with Tax trans-Activation of Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene Expression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1623–1627.
- Leung, K., and Nabel, G.J. (1988). HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- $\kappa$ B-like factor. *Nature* 333, 776–778.
- Leung, T.H., Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2004). One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF- $\kappa$ B dimers. *Cell* 118, 453–464.
- Li, G., Ruan, X., Auerbach, R.K., Sandhu, K.S., Zheng, M., Wang, P., Poh, H.M., Goh, Y., Lim, J., Zhang, J., et al. (2012). Extensive Promoter-Centered Chromatin Interactions Provide a Topological Basis for Transcription Regulation. *Cell* 148, 84–98.
- Li, L., Song, Y., Shi, X., Liu, J., Xiong, S., Chen, W., Fu, Q., Huang, Z., Gu, N., and Zhang,

R. (2018). The landscape of miRNA editing in animals and its impact on miRNA biogenesis and targeting. *Genome Res.* 28, 132–143.

Lim, C.-A., Yao, F., Wong, J.J.-Y., George, J., Xu, H., Chiu, K.P., Sung, W.-K., Lipovich, L., Vega, V.B., Chen, J., et al. (2007a). Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol. Cell* 27, 622–635.

Lim, C.-A., Yao, F., Wong, J.J.-Y., George, J., Xu, H., Chiu, K.P., Sung, W.-K., Lipovich, L., Vega, V.B., Chen, J., et al. (2007b). Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol. Cell* 27, 622–635.

Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y., and Liu, Z.-R. (2005a). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7484–7493.

Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y., and Liu, Z.-R. (2005b). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7484–7493.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 63–68.

Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., et al. (2015). A Cytoplasmic NF-κB Interacting Long Noncoding RNA Blocks IκB Phosphorylation and Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell* 27, 370–381.

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-κB pathway. *Virology* 386, 68–78.

Lu, H., Pise-Masison, C.A., Fletcher, T.M., Schiltz, R.L., Nagaich, A.K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P.A., and Brady, J.N. (2002). Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4450–4462.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327, 996–1000.

Lundblad, J.R., Kwok, R.P., Lurance, M.E., Huang, M.S., Richards, J.P., Brennan, R.G., and Goodman, R.H. (1998). The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.* 273, 19251–19259.

Macaire, H., Riquet, A., Moncollin, V., Biéumont-Trescol, M.-C., Dodon, M.D., Hermine, O., Debaud, A.-L., Mahieux, R., Mesnard, J.-M., Pierre, M., et al. (2012). Tax Protein-induced Expression of Antiapoptotic Bfl-1 Protein Contributes to Survival of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)-infected T-cells. *J. Biol. Chem.* 287, 21357–21370.

Macatonia, S.E., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Knight, S.C. (1992). Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1699–1706.

Mahgoub, M., Yasunaga, J.-I., Iwami, S., Nakaoka, S., Koizumi, Y., Shimura, K., and Matsuoka, M. (2018). Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E1269–E1278.

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, L.M. (2000). In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J. Virol.* 74, 9525–9531.

Mao, X., Su, Z., and Mookhtiar, A.K. (2016). Long non-coding RNA: a versatile regulator of the nuclear factor- $\kappa$ B signalling circuit. *10*.

Marina, R.J., Sturgill, D., Bailly, M.A., Thenoz, M., Varma, G., Prigge, M.F., Nanan, K.K., Shukla, S., Haque, N., and Oberdoerffer, S. (2016). TET-catalyzed oxidation of intragenic 5-methylcytosine regulates CTCF-dependent alternative splicing. *EMBO J.* *35*, 335–355.

Mariner, J.M., Lantz, V., Waldmann, T.A., and Azimi, N. (2001). Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 2602–2609.

Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M., et al. (2003). Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12247–12252.

de la Mata, M., and Kornblihtt, A.R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 973–980.

de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Mol. Cell* *12*, 525–532.

Matsumoto, J., Ohshima, T., Isono, O., and Shimotohno, K. (2005). HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* *24*, 1001–1010.

Matsuoka, M., and Yasunaga, J. (2013). Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr. Opin. Virol.* *3*, 684–691.

Matsuoka, E., Usuku, K., Jonosono, M., Takenouchi, N., Izumo, S., and Osame, M. (2000). CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* *102*, 1–7.

Maunakea, A.K., Chepelev, I., Cui, K., and Zhao, K. (2013). Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.* *23*, 1256–1269.

Mazurek, A., Luo, W., Krasnitz, A., Hicks, J., Powers, R.S., and Stillman, B. (2012). DDX5 Regulates DNA Replication And Is Required For Cell Proliferation In A Subset Of Breast Cancer Cells. *Cancer Discov.* *2*, 812–825.

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 Pathog.* *4*, e1000027.

Melamed, A., Laydon, D.J., Gillet, N.A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2013). Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection. *PLoS Pathog.* *9*, e1003271.

Melamed, A., Yaguchi, H., Miura, M., Witkover, A., Fitzgerald, T.W., Birney, E., and Bangham, C.R. (2018). The human leukemia virus HTLV-1 alters the structure and transcription of host chromatin in cis. *ELife* *7*, e36245.

Mercer, T.R., Edwards, S.L., Clark, M.B., Neph, S.J., Wang, H., Stergachis, A.B., John, S., Sandstrom, R., Li, G., Sandhu, K.S., et al. (2013). DNase I-hypersensitive exons colocalize with promoters and distal regulatory elements. *Nat. Genet.* *45*, 852–859.

Mitobe, Y., Yasunaga, J., Furuta, R., and Matsuoka, M. (2015). HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival. *Cancer Res.* *75*, 4143–4152.

Mocquet, V., Neusiedler, J., Rende, F., Cluet, D., Robin, J.-P., Terme, J.-M., Dodon, M.D., Wittmann, J., Morris, C., Hir, H.L., et al. (2012). The Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein Inhibits Nonsense-Mediated mRNA Decay by Interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J. Virol.* *86*, 7530–7543.

Mooney, S.M., Grande, J.P., Salisbury, J.L., and Janknecht, R. (2010). Sumoylation of p68

and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* *49*, 1–10.

Morgan, S.L., Mariano, N.C., Bermudez, A., Arruda, N.L., Wu, F., Luo, Y., Shankar, G., Jia, L., Chen, H., Hu, J.-F., et al. (2017). Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nat. Commun.* *8*, 15993.

Mori, N., Murakami, S., Oda, S., and Eto, S. (1994). Human T-cell leukemia virus type I tax induces intracellular adhesion molecule-1 expression in T cells. *Blood* *84*, 350–351.

Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D.W., and Yamamoto, N. (1999). Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* *93*, 2360–2368.

Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2001a). Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes* *22*, 279–287.

Mori, N., Morishita, M., Tsukazaki, T., Giam, C.Z., Kumatori, A., Tanaka, Y., and Yamamoto, N. (2001b). Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-dependent transforming growth factor beta signaling through interaction with CREB-binding protein/p300. *Blood* *97*, 2137–2144.

Mori, N., Yamada, Y., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Tsukasaki, K., Tanaka, Y., Tomonaga, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2002). Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* *100*, 1828–1834.

Mortreux, F., Leclercq, I., Gabet, A.S., Leroy, A., Westhof, E., Gessain, A., Wain-Hobson, S., and Wattel, E. (2001). Somatic mutation in human T-cell leukemia virus type 1 provirus and flanking cellular sequences during clonal expansion in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 367–377.

Mühleisen, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2014). Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell Death Dis.* *5*, e1575.

Naftelberg, S., Schor, I.E., Ast, G., and Kornblihtt, A.R. (2015). Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 165–198.

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.

Nagai, M., Brennan, M.B., Sakai, J.A., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* *98*, 1858–1861.

Nasr, R., Chiari, E., El-Sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., de Thé, H., Pique, C., et al. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* *107*, 4021–4029.

Nejmeddine, M., and Bangham, C.R.M. (2010). The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses* *2*, 1427–1447.

Nejmeddine, M., Barnard, A.L., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J. Biol. Chem.* *280*, 29653–29660.

Nejmeddine, M., Negi, V.S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2009). HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* *114*, 1016–1025.

Nicot, C. (2015). HTLV-I Tax-Mediated Inactivation of Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair Pathways Contribute to Cellular Transformation: “A Random Mutagenesis Model.” *J.*

Cancer Sci. 2.

Nicot, C., Opavsky, R., Mahieux, R., Johnson, J.M., Brady, J.N., Wolff, L., and Franchini, G. (2000). Tax oncoprotein trans-represses endogenous B-myb promoter activity in human T cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1629–1632.

Nicot, C., Dunder, M., Johnson, J.M., Fullen, J.R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G.L., Derse, D., Misteli, T., and Franchini, G. (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat. Med.* 10, 197–201.

Nojima, T., Rebelo, K., Gomes, T., Grosso, A.R., Proudfoot, N.J., and Carmo-Fonseca, M. (2018). RNA Polymerase II Phosphorylated on CTD Serine 5 Interacts with the Spliceosome during Co-transcriptional Splicing. *Mol. Cell* 72, 369-379.e4.

Okayama, A., Stuver, S., Iga, M., Okamoto, M., Mueller, N., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Tachibana, N., and Tsubouchi, H. (2001). Sequential change of virus markers in seroconverters with community-acquired infection of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* 183, 1031–1037.

Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W., et al. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* 36, 1065–1071.

Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16, 83–89.

Paiva, A., and Casseb, J. (2014). Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 265–274.

Papantonis, A., Larkin, J.D., Wada, Y., Ohta, Y., Ihara, S., Kodama, T., and Cook, P.R. (2010). Active RNA Polymerases: Mobile or Immobile Molecular Machines? *PLoS Biol.* 8, e1000419.

Papantonis, A., Kohro, T., Baboo, S., Larkin, J.D., Deng, B., Short, P., Tsutsumi, S., Taylor, S., Kanki, Y., Kobayashi, M., et al. (2012). TNF $\alpha$  signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed: Specialized transcription factories. *EMBO J.* 31, 4404–4414.

Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2006). Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 281, 8927–8938.

Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., and Jeang, K.-T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18974–18979.

Pène, S., Waast, L., Bonnet, A., Bénit, L., and Pique, C. (2014). A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF- $\kappa$ B Pathway Activation. *J. Virol.* 88, 10655–10661.

Petropoulos, L., Lin, R., and Hiscott, J. (1996). Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology* 225, 52–64.

Phillips, A.A., and Harewood, J.C.K. (2018). Adult T Cell Leukemia-Lymphoma (ATL): State of the Art. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 13, 300–307.

Phillips, E.H., Hodson, A., Hermine, O., Bazarbachi, A., and Cwynarski, K. (2016). Striving to cure adult T-cell leukaemia/lymphoma: a role for allogeneic stem cell transplant? *Bone Marrow Transplant.* 51, 1549–1555.

Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* 3.

Pique, C., Ureta-Vidal, A., Gessain, A., Chancerel, B., Gout, O., Tamouza, R., Agis, F., and Dokh elar, 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. *J. Exp. Med.* *191*, 567–572.

Pires, B.R.B., Silva, R.C.M.C., Ferreira, G.M., and Abdelhay, E. (2018). NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes* *9*.

Pise-Masison, C.A., Mahieux, R., Jiang, H., Ashcroft, M., Radonovich, M., Duvall, J., Guillerm, C., and Brady, J.N. (2000). Inactivation of p53 by Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Tax Requires Activation of the NF-κB Pathway and Is Dependent on p53 Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3377–3386.

Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Mahieux, R., Chatterjee, P., Whiteford, C., Duvall, J., Guillerm, C., Gessain, A., and Brady, J.N. (2002). Transcription Profile of Cells Infected with Human T-cell Leukemia Virus Type I Compared with Activated Lymphocytes. *Cancer Res.* *62*, 3562–3571.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7415–7419.

Pradeepa, M.M., Sutherland, H.G., Ule, J., Grimes, G.R., and Bickmore, W.A. (2012). Psp1/Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *PLoS Genet.* *8*, e1002717.

Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Soares, B.C., and Murphy, E.L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* *24*, 6058–6068.

Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* *12*, 1231–1245.

Rayne, F., Kajava, A.V., Lalanne, J., and Mamoun, R.Z. (2004). In vivo homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA gives clues to the retroviral capsid and TM envelope protein arrangement. *J. Mol. Biol.* *343*, 903–916.

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*, 334–345.

Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Dalgleish, A.G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* *64*, 5682–5687.

Rieder, D., Trajanoski, Z., and McNally, J.G. (2012). Transcription factories. *Front. Genet.* *3*.

Robek, M.D., and Ratner, L. (1999). immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* *73*, 4856–4865.

Roscigno, R.F., and Garcia-Blanco, M.A. (1995). SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA* *1*, 692–706.

Rosewick, N., Durkin, K., Artesi, M., Marçais, A., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Avettand-Fenoel, V., Burny, A., Charlier, C., et al. (2017a). *Cis*-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat. Commun.* *8*, 15264.

Rosewick, N., Durkin, K., Artesi, M., Marçais, A., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Avettand-Fenoel, V., Burny, A., Charlier, C., et al. (2017b). *Cis*-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat. Commun.* *8*, 15264.

Rossow, K.L., and Janknecht, R. (2003). Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* *22*, 151–156.

Rouet, F., Rabier, R., Foucher, C., Chancerel, B., Agis, F., and Strobel, M. (1999). Geographical clustering of human T-cell lymphotropic virus type I in Guadeloupe, an endemic Caribbean area. *Int. J. Cancer* *81*, 330–334.

Ruben, S., Poteat, H., Tan, T.H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W., and Rosen, C.A.

(1988). Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* *241*, 89–92.

Ruiz-Velasco, M., Kumar, M., Lai, M.C., Bhat, P., Solis-Pinson, A.B., Reyes, A., Kleinsorg, S., Noh, K.-M., Gibson, T.J., and Zaugg, J.B. (2017). CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals. *Cell Syst.* *5*, 628-637.e6.

Rushing, A.W., Hoang, K., Polakowski, N., and Lemasson, I. (2018a). The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Basic Leucine Zipper Factor Attenuates Repair of Double-Stranded DNA Breaks via Nonhomologous End Joining. *J. Virol.* *92*.

Rushing, A.W., Hoang, K., Polakowski, N., and Lemasson, I. (2018b). The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Basic Leucine Zipper Factor Attenuates Repair of Double-Stranded DNA Breaks via Nonhomologous End Joining. *J. Virol.* *92*.

Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2003). Modulation of NF- $\kappa$ B Activity by Exchange of Dimers. *Mol. Cell* *11*, 1563–1574.

Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., and Muchardt, C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 $\gamma$  favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 337–344.

Saito, K., Saito, M., Taniura, N., Okuwa, T., and Ohara, Y. (2010). Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology* *403*, 173–180.

Salehi, M., Shokouhi Mostafavi, S.K., Ghasemian, A., Gholami, M., Kazemi-Vardanjani, A., and Rahimi, M.K. (2017). Seroepidemiology of HTLV-1 and HTLV-2 Infection in Neyshabur City, North-Eastern Iran, during 2010-2014. *Iran. Biomed. J.* *21*, 57–60.

Sallam, T., Jones, M., Thomas, B.J., Wu, X., Gilliland, T., Qian, K., Eskin, A., Casero, D., Zhang, Z., Sandhu, J., et al. (2018). Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA. *Nat. Med.* *24*, 304–312.

Samaan, S., Tranchevent, L.-C., Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Zonta, E., Germann, S., Gratadou, L., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2014). The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2197–2207.

Sarkar, M., Khare, V., and Ghosh, M.K. (2017). The DEAD box protein p68: a novel coactivator of Stat3 in mediating oncogenesis. *Oncogene* *36*, 3080–3093.

Sasaki, H., Nishikata, I., Shiraga, T., Akamatsu, E., Fukami, T., Hidaka, T., Kubuki, Y., Okayama, A., Hamada, K., Okabe, H., et al. (2005). Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* *105*, 1204–1213.

Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 720–725.

Satou, Y., Utsunomiya, A., Tanabe, J., Nakagawa, M., Nosaka, K., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* *9*, 46.

Schmitz, M.L., and Baeuerle, P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* *10*, 3805–3817.

Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., et al. (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat. Genet.* *42*, 53–61.

Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., and Kornblihtt, A.R. (2009). Neuronal cell

depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4325–4330.

Schor, I.E., Fiszbein, A., Petrillo, E., and Kornblihtt, A.R. (2013). Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing in neuronal differentiation. *EMBO J.* *32*, 2264–2274.

Schreiber, J., Jenner, R.G., Murray, H.L., Gerber, G.K., Gifford, D.K., and Young, R.A. (2006). Coordinated binding of NF- $\kappa$ B family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 5899–5904.

Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3618–3622.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* *47*, 921–928.

Shayevitch, R., Askayo, D., Keydar, I., and Ast, G. (2018). The Importance of DNA Methylation of Exons on Alternative Splicing. *RNA rna.064865.117*.

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-kappaB activation. *J. Virol.* *81*, 13735–13742.

Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* *79*, 428–437.

Shin, S., Rossow, K.L., Grande, J.P., and Janknecht, R. (2007). Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Res.* *67*, 7572–7578.

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- $\kappa$ B activation. *Front. Microbiol.* *4*, 231.

Shudofsky, A.M.D., and Giam, C.-Z. (2019). Cells of adult T-cell leukemia evade HTLV-1 Tax/NF- $\kappa$ B hyperactivation-induced senescence. *Blood Adv.* *3*, 564–569.

Shuh, M., and Derse, D. (2000). Ternary complex factors and cofactors are essential for human T-cell leukemia virus type 1 tax transactivation of the serum response element. *J. Virol.* *74*, 11394–11397.

Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., and Oberdoerffer, S. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* *479*, 74–79.

Sibon, D., Gabet, A.-S., Zandecki, M., Pinatel, C., Thête, J., Delfau-Larue, M.-H., Rabaaoui, S., Gessain, A., Gout, O., Jacobson, S., et al. (2006). HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. *J. Clin. Invest.* *116*, 974–983.

Sims, R.J., Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., and Reinberg, D. (2007). Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Post-Initiation Factors and pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell* *28*, 665–676.

Smallwood, A., Hon, G.C., Jin, F., Henry, R.E., Espinosa, J.M., and Ren, B. (2012). CBX3 regulates efficient RNA processing genome-wide. *Genome Res.* *22*, 1426–1436.

Sun, S.C., Elwood, J., Béraud, C., and Greene, W.C. (1994). Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF-kappa B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7377–7384.

Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529–533.

Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel

homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* 9, 3099–3105.

Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* 109, 559–567.

Tam, W.F., Lee, L.H., Davis, L., and Sen, R. (2000). Cytoplasmic Sequestration of Rel Proteins by I $\kappa$ B $\alpha$  Requires CRM1-Dependent Nuclear Export. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2269–2284.

Tanaka, G., Okayama, A., Watanabe, T., Aizawa, S., Stuver, S., Mueller, N., Hsieh, C.-C., and Tsubouchi, H. (2005). The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J. Infect. Dis.* 191, 1140–1147.

Tatewaki, M., Yamaguchi, K., Matsuoka, M., Ishii, T., Miyasaka, M., Mori, S., Takatsuki, K., and Watanabe, T. (1995). Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Blood* 86, 3109–3117.

Tattermusch, S., Skinner, J.A., Chaussabel, D., Banchereau, J., Berry, M.P., McNab, F.W., O’Garra, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* 8, e1002480.

Thénoz, M., Vernin, C., Mortada, H., Karam, M., Pinatel, C., Gessain, A., Webb, T.R., Auboeuf, D., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology* 11, 119.

Tian, B., Nowak, D.E., and Brasier, A.R. (2005). A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF- $\kappa$ B control. *BMC Genomics* 6, 137.

Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol. Cell* 47, 596–607.

Tsukada, J., Misago, M., Serino, Y., Ogawa, R., Murakami, S., Nakanishi, M., Tonai, S., Kominato, Y., Morimoto, I., Auron, P.E., et al. (1997). Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the promoter of human prointerleukin-1 $\beta$  gene through association with two transcription factors, nuclear factor-interleukin-6 and Spi-1. *Blood* 90, 3142–3153.

Tsukahara, T., Kannagi, M., Ohashi, T., Kato, H., Arai, M., Nunez, G., Iwanaga, Y., Yamamoto, N., Ohtani, K., Nakamura, M., et al. (1999a). Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J. Virol.* 73, 7981–7987.

Tsukahara, T., Kannagi, M., Ohashi, T., Kato, H., Arai, M., Nunez, G., Iwanaga, Y., Yamamoto, N., Ohtani, K., Nakamura, M., et al. (1999b). Induction of Bcl-xL Expression by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax through NF- $\kappa$ B in Apoptosis-Resistant T-Cell Transfectants with Tax. *J. Virol.* 73, 7981–7987.

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.

Ueki, K., Fruman, D.A., Brachmann, S.M., Tseng, Y.-H., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2002). Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell. Biol.* 22, 965–977.

Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscelli, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20738–20743.

Vargas, D.Y., Shah, K., Batish, M., Levandoski, M., Sinha, S., Marras, S.A.E., Schedl, P., and

Tyagi, S. (2011). Single-Molecule Imaging of Transcriptionally Coupled and Uncoupled Splicing. *Cell* *147*, 1054–1065.

Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., and Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect. Dis.* *7*, 266–281.

Vernin, C., Thenoz, M., Pinatel, C., Gessain, A., Gout, O., Delfau-Larue, M.-H., Nazaret, N., Legras-Lachuer, C., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res.* *74*, 6082–6093.

Wäldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B.R., and Grassmann, R. (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* *107*, 4491–4499.

Wang, E., and Cambi, F. (2009). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins H and F Regulate the Proteolipid Protein/DM20 Ratio by Recruiting U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein through a Complex Array of G Runs. *J. Biol. Chem.* *284*, 11194–11204.

Wang, R., Jiao, Z., Li, R., Yue, H., and Chen, L. (2012). p68 RNA helicase promotes glioma cell proliferation in vitro and in vivo via direct regulation of NF- $\kappa$ B transcription factor p50. *Neuro-Oncol.* *14*, 1116–1124.

Wang, W., Zhou, J., Shi, J., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2014). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax-deregulated autophagy pathway and c-FLIP expression contribute to resistance against death receptor-mediated apoptosis. *J. Virol.* *88*, 2786–2798.

Warner, D.R., Bhattacharjee, V., Yin, X., Singh, S., Mukhopadhyay, P., Pisano, M.M., and Greene, R.M. (2004). Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 70–76.

Watanabe, T. (2017). Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood* *129*, 1071–1081.

Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M., Ishida, T., Aizawa, S., Maruyama-Nagai, M., Utsunomiya, A., Koga, S., Yamada, Y., Kamihira, S., et al. (2005). Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* *106*, 2462–2471.

Wattel, E., Cavrois, M., Gessain, A., and Wain-Hobson, S. (1996). Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *13 Suppl 1*, S92-99.

Weimann, T.K., Wagner, C., Funk, R., Goos, M., Wagner, S.N., and Hirche, H. (2001). Hyaluronan-Independent Adhesion of CD44H<sup>+</sup> and CD44v10<sup>+</sup> Lymphocytes to Dermal Microvascular Endothelial Cells and Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 949–957.

Weinberg, M.S., Villeneuve, L.M., Ehsani, A., Amarzguioui, M., Aagaard, L., Chen, Z.-X., Riggs, A.D., Rossi, J.J., and Morris, K.V. (2006). The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA N. Y. N* *12*, 256–262.

Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., and Meyermann, R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* *9*, 271–277.

Wiktor, S.Z., Pate, E.J., Rosenberg, P.S., Barnett, M., Palmer, P., Medeiros, D., Maloney, E.M., and Blattner, W.A. (1997). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J. Hum. Virol.* *1*, 37–44.

Wilson, B.J., Bates, G.J., Nicol, S.M., Gregory, D.J., Perkins, N.D., and Fuller-Pace, F.V. (2004). The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol. Biol.* *5*, 11.

Wu, X., and Sun, S.C. (2007). Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep.* *8*, 510–

515.

- Wu, K., Bottazzi, M.E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S.D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A., et al. (2004). Protein profile of tax-associated complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 495–508.
- Xu, L., Nirwane, A., and Yao, Y. (2019). Basement membrane and blood–brain barrier. *Stroke Vasc. Neurol.* 4, 78–82.
- Yamagishi, M., Nakano, K., Miyake, A., Yamochi, T., Kagami, Y., Tsutsumi, A., Matsuda, Y., Sato-Otsubo, A., Muto, S., Utsunomiya, A., et al. (2012). Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21, 121–135.
- Yamano, Y., Cohen, C.J., Takenouchi, N., Yao, K., Tomaru, U., Li, H.-C., Reiter, Y., and Jacobson, S. (2004). Increased Expression of Human T Lymphocyte Virus Type I (HTLV-I) Tax11-19 Peptide–Human Histocompatibility Leukocyte Antigen A\*201 Complexes on CD4+ CD25+T Cells Detected by Peptide-specific, Major Histocompatibility Complex–restricted Antibodies in Patients with HTLV-I–associated Neurologic Disease. *J. Exp. Med.* 199, 1367–1377.
- Yanagihara, R., Jenkins, C.L., Alexander, S.S., Mora, C.A., and Garruto, R.M. (1990). Human T lymphotropic virus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by western analysis. *J. Infect. Dis.* 162, 649–654.
- Yang, L., Lin, C., Zhao, S., Wang, H., and Liu, Z.-R. (2007). Phosphorylation of p68 RNA helicase plays a role in platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by up-regulating cyclin D1 and c-Myc expression. *J. Biol. Chem.* 282, 16811–16819.
- Yang, X.-D., Huang, B., Li, M., Lamb, A., Kelleher, N.L., and Chen, L.-F. (2009). Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *EMBO J.* 28, 1055–1066.
- Yao, H., Brick, K., Evrard, Y., Xiao, T., Camerini-Otero, R.D., and Felsenfeld, G. (2010). Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes Dev.* 24, 2543–2555.
- Yearim, A., Gelfman, S., Shayevitch, R., Melcer, S., Glaich, O., Mallm, J.-P., Nissim-Rafinia, M., Cohen, A.-H.S., Rippe, K., Meshorer, E., et al. (2015). HP1 is involved in regulating the global impact of DNA methylation on alternative splicing. *Cell Rep.* 10, 1122–1134.
- Yin, M.J., Christerson, L.B., Yamamoto, Y., Kwak, Y.T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M.H., and Gaynor, R.B. (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 93, 875–884.
- Yoshida, N., and Chihara, D. (2015). Incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma in nonendemic areas. *Curr. Treat. Options Oncol.* 16, 7.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2031–2035.
- Yoshida, M., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2534–2537.
- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Fujisawa, J.-I., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J. Virol.* 82, 9359–9368.
- Young, J.I., Hong, E.P., Castle, J.C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A.B., Rose, M.F., Kang, D., Richman, R., Johnson, J.M., Berget, S., et al. (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17551–17558.

Zane, L., Sibon, D., Legras, C., Lachuer, J., Wierinckx, A., Mehlen, P., Delfau-Larue, M.-H., Gessain, A., Gout, O., Pinatel, C., et al. (2010). Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8<sup>+</sup> cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* *407*, 341–351.

Zane, L., Sibon, D., Capraro, V., Galia, P., Karam, M., Delfau-Larue, M.-H., Gilson, E., Gessain, A., Gout, O., Hermine, O., et al. (2012). HTLV-1 positive and negative T cells cloned from infected individuals display telomerase and telomere genes deregulation that predominate in activated but untransformed CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. J. Cancer* *131*, 821–833.

Zhang, H., Xing, Z., Mani, S.K.K., Bancel, B., Durantel, D., Zoulim, F., Tran, E.J., Merle, P., and Andrisani, O. (2016). RNA helicase DEAD box protein 5 regulates Polycomb repressive complex 2/Hox transcript antisense intergenic RNA function in hepatitis B virus infection and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* *64*, 1033–1048.

Zhang, W., Nisbet, J.W., Albrecht, B., Ding, W., Kashanchi, F., Bartoe, J.T., and Lairmore, M.D. (2001). Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J. Virol.* *75*, 9885–9895.

Zhang, Z., Jones, A., Joo, H.-Y., Zhou, D., Cao, Y., Chen, S., Erdjument-Bromage, H., Renfrow, M., He, H., Tempst, P., et al. (2013). USP49 deubiquitinates histone H2B and regulates cotranscriptional pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* *27*, 1581–1595.

Zhao, B., Barrera, L.A., Ersing, I., Willox, B., Schmidt, S.C.S., Greenfield, H., Zhou, H., Mollo, S.B., Shi, T.T., Takasaki, K., et al. (2014). The NF- $\kappa$ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep.* *8*, 1595–1606.

Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* *113*, 2755–2764.

Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator. *Blood* *118*, 1865–1876.

Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y.-L., Ho, Y.-K., Shih, H.-M., and Giam, C.-Z. (2011). NF- $\kappa$ B hyperactivation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* *7*, e1002025.

Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* *9*, 625–636.

Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R., and Brady, J.N. (2006). Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J. Virol.* *80*, 4781–4791.

Zhu, L.J., Holmes, B.R., Aronin, N., and Brodsky, M.H. (2014). CRISPRseek: A Bioconductor Package to Identify Target-Specific Guide RNAs for CRISPR-Cas9 Genome-Editing Systems. *PLOS ONE* *9*, e108424.

Zonta, E., Bittencourt, D., Samaan, S., Germann, S., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2013). The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Res.* *41*, 554–564.