



HAL
open science

Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération cellulaire induite par la protéine HBZ du rétrovirus HTLV-1

Marie Terol

► **To cite this version:**

Marie Terol. Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération cellulaire induite par la protéine HBZ du rétrovirus HTLV-1. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT: 2016MONTT012 . tel-02986734

HAL Id: tel-02986734

<https://theses.hal.science/tel-02986734>

Submitted on 3 Nov 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **CBS2**
Et de l'unité de recherche **CPBS FRE3689 CNRS**

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Marie TEROL**

**Caractérisation des mécanismes
moléculaires impliqués dans la
prolifération cellulaire induite par la
protéine HBZ du rétrovirus HTLV-1**

Soutenue le 27 septembre 2016 devant le jury composé de

Hélène DUTARTRE, CR1, CIRI
Franck MORTREUX, CR1, LBMC
Madeleine DUC DODON, DR2, LBMC
Thierry DUPRESSOIR, DE, EPHE
Isabelle JARIEL-ENCONTRE, CR1, IGMM
Jean-Michel MESNARD, DR1, CPBS

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse



« Toute certitude est par essence contradictoire avec la philosophie de la recherche. »

Pierre Joliot / La recherche passionnément

REMERCIEMENTS

Comment m'atteler à cet exercice périlleux, trois années de thèse étant difficiles à résumer en quelques lignes ? J'en profite donc pour, d'ores et déjà, m'excuser auprès des personnes que je vais peut-être oublier. A ma décharge, je ne suis plus sûre d'être tout à fait saine d'esprit après ces mois de rédaction et d'insomnies ininterrompues !

Je tiens tout d'abord à remercier les lecteurs et correcteurs de cette thèse. Merci à Isabelle Jariel-Encontre et Thierry Dupressoir d'avoir suivi et évalué ces travaux de thèse pendant trois ans, et d'avoir tout de même accepté de faire partie de mon jury. Merci également à Madeleine Duc Dodon, Hélène Dutartre, et Franck Mortreux, d'avoir consacré une partie de leur temps pour l'évaluation de cette thèse.

Je me dois de remercier le Ministère de la recherche, l'Université de Montpellier, et l'école doctorale CBS2, pour m'avoir octroyé une bourse de thèse et permis de réaliser mon vœu de poursuivre en doctorat après mon master. Un grand merci à Sandrine Urvoy, qui anime à elle seule le secrétariat de l'école doctorale et m'a été d'une aide précieuse. Je tiens aussi à remercier l'équipe de direction de l'institut, composée de Jean-Michel Mesnard, Stéphane Köhler, et Pierre Diamante, pour m'avoir accueillie dans leur locaux et permis de travailler dans de bonnes conditions. Je remercie également le personnel de la cellule support, qui fait un travail remarquable, et tout particulièrement Christine Gagnere, Sandrine Peired, Martine Michaud, Pascale Bouhours, et Hugues Babeur.

Bien sûr, qu'est-ce qu'un doctorant sans son équipe ? Je tiens donc à exprimer ma reconnaissance toute particulière à Jean-Michel (je m'adresse ici au chef d'équipe...), pour m'avoir admise dans son équipe, d'abord en tant que stagiaire de master 2, puis en tant que thésarde. Je te remercie pour le temps que tu m'as consacré, aussi bien pour la préparation du concours de l'école doctorale que durant ma thèse. Merci d'avoir su m'écouter et répondre à mes attentes, de m'avoir donné le temps de rédiger ce manuscrit, et de l'avoir corrigé. Merci aussi de m'avoir permis de retourner à Greenville pour discuter boulot avec Isabelle et Nick, et d'assister au congrès en Martinique.

Je remercie également Jean-Marie, grâce auquel les travaux sur HBZ et la traduction de Δ JunD ont pu autant avancer. Merci de m'avoir trimbalée avec toi en Martinique, dans ta famille, et de m'avoir fait visiter le pays, j'en garde de bons souvenirs. Charlotte, je te suis vraiment reconnaissante d'avoir pris sur ton temps pour me transmettre ton expérience sur les Immunoblots et m'initier aux techniques de test rapporteur et d'immunofluorescence. Un énorme merci à Antoine pour la mise en place des PCR quantitatives et leur analyse, ainsi qu'à Bruno pour m'avoir aidée pour les IF et initiée à la microscopie confocale, non sans risques ! Merci aux petits derniers qui ont fraîchement rejoint l'équipe : Malvina, Juliette, et Viet. Dommage que vous ne soyez pas arrivés plus tôt ! Merci à Elodie, Dimitri, Sophie, que j'aurais aimé connaître d'avantage, et aux autres membres de passage dans l'équipe. Sarkis et Hélène, vous êtes partis peu de temps avant le début de ma thèse mais je n'oublierai jamais les bons moments que nous avons passés ensemble. Hélène, tu m'as prise sous ton aile, initiée à certaines techniques, et accueillie dans ta famille en Martinique. Malgré le peu de temps passé ensemble et l'éloignement, tu es restée une excellente amie et j'espère que nos chemins se recroiseront bientôt. Simon, Christophe, et Daniel, le Trio de Choc, merci pour votre soutien moral et technique, vous qui avez quitté l'équipe pour voguer vers de nouveaux horizons. Célia, Adeline, Lucie, et tous les autres, je n'oublie pas nos soirées... Roy, mon camarade de rédaction, merci pour ta bonne humeur, tes huiles essentielles, et ton soutien. Et toutes les personnes du labo

avec lesquelles j'ai pu échanger, voire tisser des liens (Sébastien, Rahila, Laurent, Latifa...), et mon ami de la fac, Mahdi, pour ne pas m'avoir oubliée.

Dear Kimson and Diana, I would like to thank you for welcoming me so warmly when I first arrived at Greenville. I keep a very strong and bright memory of those five months spent in your company. Isabelle and Nick, I must definitely thank you for accomplishing all of that work on BDNF, I strongly regret not having been there to help you finish this work. Beyond that, I would like to thank you for the way you have welcomed me into your lab and your house. It really helped me to handle the fact of being separated from my family for the first time. I have to say, you are the scientists with the best human qualities I have ever seen. Merci encore Isabelle pour tes corrections et tes conseils.

Enfin, je souhaite remercier ma famille, sans laquelle rien de tout cela n'aurait été possible : mes grands-parents et mon parrain Romain. Un grand merci à Tiouf : on est amis depuis l'adolescence ; merci d'être resté fidèle au poste ! Mille mercis au noyau dur : maman, Pierre (mon petit débrouillard de frère), et Bruno (mon oncle psychopathe). Vous êtes mon équilibre, ma boussole, et vous avez toujours su me soutenir dans les moments difficiles, comme au quotidien. Merci tout particulièrement à toi, maman, tu as toujours été là pour moi et m'a poussée à aller jusqu'au bout dans ce que j'entreprends. Et merci pour la relecture de ce manuscrit. Albertus, om jou te ontmoet was 'n keepunt in my lewe. Dankie dat jy my elke dag ondersteun en nooit skrik gekry het nie. Ek sien uit na wat hierdié avontuur saam met jou volgende vir ons inhou.

RESUME

Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) est l'agent étiologique d'une forme rare et très agressive de leucémie de l'adulte (ATL). Le processus leucémogène a longtemps été attribué à la seule action de l'oncoprotéine Tax. Cependant, une nouvelle protéine virale, appelée HBZ (HTLV-1 bZIP factor), a été découverte en 2002. Elle est codée par le brin complémentaire du génome proviral et transcrite en antisens à partir du LTR3'. HBZ s'est avéré être un acteur clef de la prolifération et de la transformation des cellules T infectées, et donc du développement de l'ATL. La présente étude propose de nouvelles pistes quant aux mécanismes par lesquels HBZ induit la survie et la prolifération cellulaire. Nous avons montré que la protéine HBZ stimule l'expression de la neurotrophine BDNF et que les cellules de patients ATL surexpriment à la fois BDNF et son récepteur TrkB. De plus, ces patients présentent une concentration sérique anormalement élevée de la forme mature de BDNF, suggérant l'existence d'une boucle autocrine/paracrine BDNF/TrkB. L'activité de cette boucle a été confirmée *in vitro* et promeut la survie des cellules infectées par HTLV-1. D'autre part, nous avons découvert qu'HBZ dérégule l'expression du suppresseur de tumeur JunD dans les cellules T infectées, et induit celle de l'isoforme potentiellement oncogène Δ JunD. La production de Δ JunD résulterait d'une altération des mécanismes d'initiation de la traduction par HBZ. Nos résultats montrent aussi que Δ JunD promeut la prolifération et la transformation cellulaire en l'absence de sérum. Nous proposons donc que son expression pourrait contribuer à l'évolution des cellules T infectées en cellules leucémiques.

Mots-clefs : *HTLV-1 ; ATL ; HBZ ; BDNF/TrkB ; JunD*

ABSTRACT

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is associated with a rare and aggressive form of adult leukemia (ATL). For a long time, leukemogenesis was thought to mainly result from the action of the Tax oncoprotein. However, a new viral protein, called HBZ (HTLV-1 bZIP factor), was discovered in 2002. It is encoded by the minus strand of the proviral genome and transcribed in antisens from the 3'LTR. Since its discovery, HBZ came out as a key player in proliferation and transformation of infected T cells, thus contributing to ATL development. In this study we provide new leads regarding the mechanisms of HBZ-induced cell survival and proliferation. On one hand, we show that HBZ stimulates the expression of the BDNF neurotrophin and that ATL cells from patients overexpress both BDNF and its high-affinity receptor TrkB. Moreover, sera from patients exhibited abnormal levels of the mature form of BDNF, suggesting the existence of a BDNF/TrkB paracrine/autocrine loop. That loop was confirmed to be activated *in vitro* and to support the survival of HTLV-1-infected cells. On the other hand, we discovered that HBZ deregulates the expression of the JunD tumor suppressor in infected T cells and induces that of the Δ JunD isoform, which is potentially oncogenic. Δ JunD production would result from alteration of the translational initiation by HBZ. Our results also show that Δ JunD induces proliferation and transformation of serum starved cells. Finally, we hypothesize that HBZ-induced expression of Δ JunD may influence infected T cells to turn leukemic.

Keywords: *HTLV-1 ; ATL ; HBZ ; BDNF/TrkB ; JunD*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
Chapitre I : Principes généraux de l'oncogenèse virale chez l'homme	14
Chapitre II : HTLV-1 et cancer	18
I. Histoire et épidémiologie	18
A. Découverte du premier rétrovirus oncogène humain	18
B. Distribution géographique et modalités de transmission	18
C. La leucémie à cellules T de l'adulte.....	19
II. Le rétrovirus complexe HTLV-1	20
A. Structure générale	20
B. Organisation génomique	20
1. Gènes structuraux et enzymatiques	22
2. Gènes régulateurs de l'expression virale	22
a. Le gène <i>tax</i>	22
b. Le gène <i>rex</i>	23
3. Gènes auxiliaires	24
a. Le gène <i>p30^{II}</i>	24
b. Le gène <i>p13^{II}</i>	25
c. Le gène <i>p12^I</i>	25
III. Les étapes clés de la leucémogénèse induite par HTLV-1.....	26
A. La primo-infection	26
1. Tropisme.....	26
2. Transmission par contact cellule-cellule	26
B. Réplication du HTLV-1 <i>in vivo</i> : l'expansion clonale	29
C. Tax, un puissant initiateur de la transformation cellulaire induite par HTLV-1...30	
1. Structure, localisation, et modifications post-traductionnelles de Tax.....30	
2. Modulation de nombreuses activités cellulaires par Tax	31
a. Activation des voies de survie et de prolifération cellulaire	31
i. Tax et la voie NF-κB.....	31
ii. Tax et la voie AP-1	33
b. Inactivation des points de contrôle cellulaire et instabilité génétique.....	34

c. Tax ne suffit pas au développement de l'ATL	35
D. HBZ, un nouvel acteur de la transformation cellulaire induite par HTLV-1	35
1. Découverte de la protéine antisens du HTLV-1	35
a. Modalités d'expression du gène <i>hbz</i>	36
b. Caractéristiques moléculaires de la protéine HBZ	39
2. HBZ permet l'acquisition de caractéristiques tumorales par la cellule infectée	40
a. Persistance de l'infection par HTLV-1	40
b. Modulation phénotypique des lymphocytes T infectés et inflammation	41
c. Instabilité génétique	41
d. Résistance à l'apoptose et prolifération des cellules infectées	42
 RESULTATS ET DISCUSSION	 45
 Article I : HBZ promeut la survie des cellules T infectées par HTLV-1 en stimulant la voie autocrine/paracrine BDNF/TrkB	 46
I. Introduction : l'axe BDNF/TrkB	46
II. Article	49
III. Discussion	63
Article 2 : HBZ transforme le suppresseur de tumeur JunD en promoteur de tumeur en inhibant l'expression de la protéine ribosomale RPS25 (manuscrit en préparation)	64
I. Introduction : JunD, un acteur majeur de la transformation cellulaire induite par <i>hbz</i>	64
II. Article	66
III. Discussion	102
 CONCLUSION	 105
 ANNEXE	 108
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 110
 TABLE DES ILLUSTRATIONS	 131

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

aa	acide aminé
ACs	asymptomatic carriers
AD	activation domain
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
A _n	queue polyA
AP-1	activator protein 1
APC	anaphase-promoting complex
APH	antisens protein of HTLV
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ASP	antisens protein
ATF	activating transcription factor
ATL	adult T-cell leukemia
ATLV	adult T-cell leukemia virus

B

BAD	Bcl-2-associated agonist of cell death
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BR	basic region
BRG1	Brahma-related gene 1
bZIP	basic leucine zipper

C

CA	protéine de capside
CamK	Calmodulin(Cam)-dependent protein kinase
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB binding protein
CD	cluster de differentiation
Cdc	cell-division cycle protein
CDK	cyclin-dependent kinase
C/EBP	CAAT/enhancer-binding protein
CENP-B	centromere protein B
c-FLIP	cellular FLICE
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CIRC	centre international de recherche sur le cancer
CMH-I	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CREM	cAMP-responsive element modulator
CRM1	chromosomal maintenance 1
CTL	cytotoxic T lymphocyte
Cy5	Cyanine 5

D

DAG	diacylglycérol
DBD	DNA binding domain
DC	dendritic cell
DC-SIGN	DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin
DFC	dense fibrillar component
DSBs	double strand breaks

E

E5, E6, E7	early protein -5, -6, -7
EBERs	EBV-encoded small RNAs
EBV	Epstein-Barr virus
EBNA	EBV nuclear antigen
eIF	eukaryotic initiation factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase

F

FADD	Fas-associated death domain protein
FC	fibrillar center
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLICE	Fas-associated death domain-like IL-1 β -converting enzyme
Foxp3	Forkhead box P3
Frs2	fibroblast growth factor receptor substrate 2

G

Gab1	Grb-associated binder 1
GADD34	growth arrest and DNA damage gene 34
gag	group-specific antigen
GC	granular component
GLUT	glucose transporter
gp	glycoprotéine
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 β

H

HAT	histone acetyltransferase
HBV	hepatitis B virus
HBx	HBV-encoded X antigen
HBZ	HTLV-1 bZIP factor
HCV	hepatitis C virus
HDAC	histone déacetylase
HERV	human endogenous retrovirus
HHV	human herpesvirus
HIC	aussi appelée MDFIC
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HR HPV	high-risk human papillomaviruses
hDlg	homolog of <i>Drosophila melanogaster</i> disc larg
hnRNPA1	heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1
HSPG	heparan sulfate proteoglycan

hSSB2 human single-strand DNA-binding protein 2
hTERT human telomerase reverse transcriptase
HTLV human T-lymphotropic virus

I

ICAM intercellular adhesion molecule
ICTV international committee on taxonomy of viruses
IFN interféron
I κ B inhibitor of NF- κ B
IKK I κ B kinase
IL interleukin
I-mfa aussi appelée MDFI
IN intégrase
IP3 inositol-1,4,5-trisphosphate
IRES internal ribosome entry site
IRF IFN regulatory factor
ITAF IRES trans-acting factors
iTreg Treg inductible

J

JAK/STAT Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JNK c-Jun N-terminal kinase

K

KIX kinase-inducible domain interacting
KSHV Kaposi's sarcoma herpesvirus

L

LANA latency-associated nuclear antigen
LEF1 lymphoid-enhancer binding factor 1
LFA lymphocyte fonction-associated antigen
LMP latent membrane protein
LT- β Lymphotoxin beta
LTR long terminal repeat

M

MA protéine de matrice
Mad1 mitotique arrest defect 1
Maf v-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAPK mitogen-activated protein (MAP) kinase
MAP3K MAP kinase kinase kinase
MCV Merkel cell polyomavirus
MDFI MyoD family inhibitor
MDFIC MDFI domain containing
MDMC monocyte-derived dendritic cell
MEK MAPK/ERK kinase
MEKK-1 MAPK/ERK kinase kinase 1
MEN1 multiple endocrine neoplasia type 1
miARN microARN
MID menin interaction domain

MLL	mixed-lineage leukemia
MMP	matrix metalloproteinase
MTOC	microtubule organizing center
mTOR	mammalian target of rapamycin
N	
NAP-1	nucleosome assembly protein 1
NC	protéine de nucléocapside
NEMO	NF- κ B essential modulator
NES	nuclear export signal
NFAR	nuclear factors associated with double-stranded RNA
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NIK	NF- κ B inducing kinase
NK	natural killer
NLS	nuclear localization signal
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NOG	NOD/SCID ^{yc-/-}
NRP	neuropilin
NS3, NS5A	nonstructural protein -3, -5A
nt	nucléotide
NTRK2	neutrophic tyrosine kinase receptor type 2
O	
Oct-1	octamer-binding transcription factor 1
ORF	open reading frame
P	
PABP	polyA binding proteins
pb	paire de bases
PBM	PDZ binding motif
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCE	post-transcriptional control element
PCR	polymerase chain reaction
p300/CBP	p300-CREB-binding protein
p/CAF	p300/CBP-associated factor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDLIM2	PDZ and LIM domain protein 2
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PLC γ 1	phospholipase C γ 1
Pol II	ARN polymérase de type II
PMA	phorbol myristate acetate
R	
R	région répétée du LTR
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RANBP1	Ran-binding protein 1

RANK	receptor activator of NF- κ B
Rb	retinoblastoma protein
RE	réticulum endoplasmique
RHA	RNA helicase A
RIP	receptor-interacting protein
RNA-BP	RNA-binding proteins
ROS	reactive oxygen species
RP	ribosomal proteins
RPS25	40S ribosomal protein S25
Rsk	ribosomal protein S6 kinase
RxRE	Rex-responsive element
S	
S	Svedberg unit
SAC	spindle assembly checkpoint
Shc	Src homology 2 domain containing protein
shRNA	short-hairpin RNA
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SM	silent mutation
SOS	son of sevenless
SP1	spliced RNA 1
Sp1	specificity protein 1
SRF	serum responsive factor
STAT	signal transducers and activators of transcription
SU	glycoprotéine de surface
SUMO	small ubiquitin-like modifier
SWI/SNF	switching-defective-sucrose non-fermenting
T	
TAB2	TAK1-binding protein 2
TAF	TBP-associated factor
TAK1	TGF- β activated kinase 1
TAL1	T-cell acute lymphoblastic leukemia 1
Tax	transcriptional activator of pX region
TBP	TATA binding protein
TCFs	ternary complex factors
TCF1	T-cell factor 1
TCR	T-cell receptor
TGF- β	transforming growth factor β
TI	transcriptase inverse
TK	domaine tyrosine kinase
TLR	Toll like receptor
TM	transmembranaire
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
TSP/HAM	tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNFR-associated factor
TRE	TPA-responsive element

Treg	Lymphocyte T régulateur
TRITC	tetramethylrhodamine isothiocyanate
TrkB	tyrosine kinase receptor B
TSS	transcription start site
TxRE	Tax-responsive element
U	
U.A.	unité arbitraire
uAUG	upstream AUG
uORF	upstream ORF
usHBZ	unspliced HBZ
UTR	untranslated region
V	
vFLIP	viral homolog of FLICE-inhibitory protein
vGPCR	viral G-protein coupled receptor
vIRF	viral IFN regulatory factor
VPA	valproate
Z	
ZF	Zinc finger

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Principes généraux de l'oncogenèse virale chez l'homme

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. En 2012, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a ainsi recensé 8,2 millions de décès suite à un cancer, et une augmentation radicale du nombre de cas diagnostiqués par an a été annoncée d'ici 2030 (International Agency for Research on Cancer and Cancer Research UK, 2014). En 2008, 16,1% des cancers humains étaient d'origine infectieuse (80% des cas étant localisés dans des pays émergents), et la plupart de ces cancers était due à une infection virale (De Martel et al., 2012). Le premier oncovirus humain découvert fut le virus d'Epstein-Barr (EBV pour « Epstein-Barr Virus ») en 1964, soit un demi-siècle après la détection de l'agent infectieux responsable du sarcome du poulet par Francis Peyton Rous (RSV pour « Rous sarcoma virus »). Pourtant caractérisé par microscopie électronique à partir de cellules dérivées de patients avec un lymphome de Burkitt, l'herpèsvirus EBV ne fut défini comme agent carcinogène qu'en 1997 par le CIRC (Moore and Chang, 2010). Depuis, seulement 6 autres virus (tableau 1) ont été identifiés et associés à un ou plusieurs cancer(s) chez l'homme (Bouvard et al., 2009, 2012). Les délais dans l'élaboration de cette liste, ainsi que son caractère restreint, découlent en partie des limitations des techniques classiques de virologie. Il est vrai que, seuls EBV et le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1 pour « human T-lymphotropic virus type 1 »), ont pu être directement caractérisés suite à la détection de leurs particules virales, car les oncovirus humains semblent adopter une stratégie commune sur le long terme : persister au sein de la cellule infectée et se répliquer sans émettre de nouveaux virions afin d'échapper au système immunitaire (Mesri et al., 2014; Moore and Chang, 2010). Une autre explication est la difficulté à établir une relation de causalité entre une infection virale et le développement d'un cancer donné. En effet, au vu de la variété des classes virales impliquées (*i.e.* herpèsvirus, rétrovirus,...) et du type de génome viral (par exemple, ADN ou ARN), il n'existe pas de famille de virus oncogène par excellence (Tableau 1). De même, au sein d'une même famille virale, seule une minorité s'avère avoir une activité tumorigène et les cas de cancer associés restent rares, indépendamment de la prévalence de l'infection. C'est le cas de l'herpèsvirus EBV, qui est porté par la majorité de la population adulte de manière asymptomatique. Aussi, les critères de causalité, basés sur l'idée que l'infection virale est nécessaire et suffisante à l'induction d'un cancer, ne sont pas applicables à l'oncogenèse humaine (Moore and Chang, 2010).

Le développement tumoral chez l'homme est un processus long et hautement complexe, dont les mécanismes demeurent encore mal compris. Toutefois, il est admis qu'il repose sur le franchissement de plusieurs barrières biologiques, plus ou moins étroitement interconnectées, qui confère à la cellule de nouvelles propriétés, et autorise de ce fait sa potentielle dérive en un clone tumoral malin. Ces caractéristiques acquises de cellule cancéreuse, réactualisées par Hanahan et Weinberg en 2011, participent à une meilleure compréhension du processus carcinogène dont elles illustrent les étapes clés : immortalisation, transformation, néoangiogenèse, invasion, et métastase (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Dans le cas des cancers humains induits par une infection virale, le principe est le même et requiert avant tout l'établissement d'une infection persistante. Ensuite, par le biais de mécanismes directs et/ou indirects, les oncovirus facilitent l'acquisition progressive du phénotype tumoral par la cellule infectée. En effet, ils codent pour des oncogènes leur permettant de se répliquer au fil des divisions cellulaires, si possible sans produire de virions, et d'échapper à la surveillance immunitaire (Mesri et al., 2014; Moore and Chang, 2010; White et al., 2014). Ces oncogènes viraux peuvent agir sous la forme de protéines, ou encore de transcrits non codants (par exemple, microARNs (miARNs)). Ils ciblent une multitude d'acteurs cellulaires (principalement proto-oncogènes, suppresseurs de tumeur, et miARNs) et vont ainsi induire, selon le type de cancer et son stade clinique, certaines caractéristiques de cellule cancéreuse, récapitulées dans le tableau 1 (Lin and Flemington, 2011; Mesri et al., 2014). En outre, la perte de la stabilité génomique et l'inflammation chronique sont connues pour faciliter l'acquisition du phénotype cancéreux

(Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). La première favorise l'apparition de mutations (ou autres altérations) au sein des génomes cellulaires et viraux, voire même l'intégration accidentelle du génome viral (Hollingworth and Grand, 2015; Mesri et al., 2014). La seconde est en fait une conséquence de la persistance de l'infection virale. Celle-ci implique la mise en place d'une réponse inflammatoire, récurrente voire permanente, qui crée localement un environnement riche en cellules immunitaires et médiateurs chimiques (radicaux libres, facteurs de croissance, de survie, de remodelage des tissus...), dans le but d'éliminer l'agent pathogène et de rétablir l'homéostasie tissulaire. Cet environnement est propice au développement tumoral du fait de son caractère mutagène (*ie.* stress oxydatif) et de la conservation anormale, en son sein, des signaux de prolifération, angiogénèse, invasion, et métastases. Par exemple, dans le cadre de l'infection par le virus de l'hépatite B (HBV pour « hepatitis B virus »), l'inflammation chronique du foie (ou hépatite) joue un rôle central dans l'émergence d'un carcinome hépatocellulaire. Bien que soutenue par l'expression de la protéine virale HBx (HBV-encoded X antigen), elle trouve surtout son origine dans l'incapacité de l'hôte à éliminer le virus. Aussi, la réponse inflammatoire est maintenue et les cycles de lésion/régénération des tissus hépatiques se succèdent, pouvant le cas échéant déboucher sur une cirrhose et un cancer du foie. L'inflammation chronique et la protéine HBx génèrent également de l'instabilité génétique, ce qui augmenterait les chances d'intégration du génome viral et participerait au processus tumoral (Henning et al., 2015; Mesri et al., 2014). L'oncogénèse induite par HBV émane donc de la conjugaison de mécanismes directs (action des oncogènes viraux) et indirects (inflammation chronique).

Malgré la variété des stratégies développées par les oncovirus pour persister et se répliquer chez l'homme, le développement d'un cancer reste accidentel. Il est le reflet de l'intervention de nombreux cofacteurs qui agissent en synergie avec l'infection virale. Ces cofacteurs peuvent être inhérents à l'hôte (état immunitaire, génétique, épigénétique) ou extrinsèques (co-infection, alimentation, style de vie, environnement). A l'instar de l'inflammation chronique, l'immunosuppression constitue un terrain favorable à l'émergence de certains cancers induits par une infection virale. Elle peut être d'origine génétique, iatrogène (par exemple, après transplantation d'un organe), ou encore due à l'âge ou bien à une co-infection. C'est pourquoi, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1 pour « human immunodeficiency virus type 1 ») est considéré comme carcinogène indirect, car il favorise l'apparition de cancers chez les patients infectés par EBV ou KSHV et atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Souvent, la conjugaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques est nécessaire à la persistance de l'infection et à son évolution cancéreuse. Ainsi, divers cofacteurs peuvent être déterminants quant à la formation d'un cancer du col de l'utérus, tels que le type de papillomavirus humain (HPV pour « human papillomavirus »), l'immunosuppression (due ou non à HIV-1), la co-infection avec la bactérie sexuellement transmissible *chlamydia*, et encore la prise d'une contraception hormonale (Mesri et al., 2014; Parkin, 2006; Schottenfeld and Beebe-Dimmer, 2015; White et al., 2014). D'autres facteurs propres à l'hôte seraient susceptibles d'intervenir dans l'oncogénèse virale. Il s'agit des rétrovirus endogènes humains (HERV pour « human endogenous retrovirus »), qui représentent plus de 8% de notre génome, et sont en fait des vestiges de l'infection de nos cellules germinales par des rétrovirus exogènes, il y a plus d'un million d'années. Parmi ces éléments, les provirus de la famille HERV-K (HML-2) sont ceux dont la structure générale a été la mieux préservée, autorisant la production de transcrits et de protéines mais pas celle de particules virales infectieuses. Leur activité a été détectée dans plusieurs cancers humains : mélanomes, lymphomes, leucémies, sarcomes, cancers du sein, de la prostate, ou bien des ovaires. Toutefois, la question de leur implication reste en suspens. Diverses hypothèses ont été émises quant à leur possible action cancérogène. On retiendra la dérégulation de gènes cellulaires à proximité de la zone d'insertion provirale *via* leur(s) LTR(s) (long terminal repeat), ainsi que l'expression de protéines virales, potentiellement oncogènes ou modulant la réponse immunitaire (inflammation chronique ou immunosuppression) (Downey et al., 2015).

Enfin, chez l'homme, l'oncogenèse virale n'est pas une conséquence directe de la présence de l'agent infectieux. Elle résulte du déséquilibre de l'interaction entre le virus et son hôte, du fait de l'ingérence de divers cofacteurs, et nécessite une période de latence. Comme tout cancer, la transformation maligne d'origine virale est jalonnée. Ceci implique l'élaboration de nouvelles stratégies prophylactiques, visant à la fois le virus (infection, cycle, et oncogènes viraux) et les caractéristiques tumorales qu'il pourrait avoir induites. Le moyen le plus efficace de lutter contre ces cancers restant la prévention d'une infection persistante, des vaccins ont été élaborés contre les virus HBV, HPV16, et HPV18, et ont déjà commencé à faire leurs preuves (Mesri et al., 2014). Pourtant, le développement de moyens de prévention et de traitement des cancers induits par une infection virale est toujours d'actualité. En effet, dans l'étude menée en 2012 par De Martel et al., le pourcentage de cancers attribué à une infection a été revu à la hausse. Ainsi, un cancer sur cinq dans le monde serait d'origine infectieuse et pourrait être évité en ciblant l'agent responsable (De Martel et al., 2012; Parkin, 2006). De plus, avec l'amélioration des techniques de détection et des critères de causalité, la liste des oncovirus humains devrait s'allonger et de nouveaux mécanismes carcinogènes pourraient être découverts. Etant donné l'ampleur du budget mondial annuel alloué au traitement du cancer, la part croissante des néoplasies dues à une infection virale et leur incidence dans les pays émergents, il est donc dans l'intérêt général de poursuivre la recherche contre le cancer.

Tableau 1 : Virus oncogènes humains, description et propriétés tumorigènes (adapté de Mesri et al., 2014; Moore and Chang, 2010; White et al., 2014).

Virus	Génome	Famille	Cancer(s) associé(s)	Tropisme(s)	Génome intégré	Protéines et transcrits oncogènes	Mécanismes potentiellement affectés par les oncogènes viraux ((+) activation ; (-) répression)
EBV	ADN db	Herpèsvirus	Lymphome de Burkitt, carcinomes nasopharyngiens, certains lymphomes	Lymphocytes B, cellules épithéliales	Épisomal	EBNA-1 et -2, LMP-1 et -2A, EBERs	(+) survie, biosynth., prolif., immort., infl., néoang., migr. (-) int. gén., surv. immun.
HBV	ADN db/sb	Hépadnavirus	Hépatocarcinome	Hépatocytes	Oui	HBx	(+) survie, biosynth., prolif., immort., infl., néoang., migr. (-) suppr. tum., int. gén., surv. immun.
HTLV-1	ARN sb positif	Rétrovirus	Leucémie/lymphome T de l'adulte	Lymphocytes T	Oui	Tax, HBZ	(+) survie, biosynth., prolif., immort. infl., migr. (-) suppr. tum., int. gén., surv. immun.
HR HPV	ADN db	Papillomavirus	Cancer du col de l'utérus, cancers ano-génitaux, cancers oro-pharyngés	Kératinocytes	Épisomal et intégré	E6, E7, E5	(+) survie, biosynth., prolif., immort., néoang., migr. (-) suppr. tum., int. gén., surv. immun.
HCV	ARN sb positif	Flavivirus	Hépatocarcinome, lymphome non Hodgkinien	Hépatocytes	Non	Core, NS3, NS5A	(+) survie, biosynth., prolif., immort., infl., néoang., migr. (-) suppr. tum., int. gén., surv. immun.
KSHV	ADN db	Herpèsvirus	Sarcome de Kaposi, lymphome des cavités, maladie de Castleman multicentrique	Lymphocytes B, cellules endothéliales, macrophages, kératinocytes	Épisomal	LANA, v-cyclin, vFLIP, vGPCR, vIRF-1	(+) survie, biosynth., prolif., immort., infl., néoang. (-) suppr. tum., int. gén., surv. immun.
MCV	ADN db	Polyomavirus	Carcinome à cellules de Merkel	Cellules de Merkel	Oui	Antigènes T et t	(+) survie, prolif. (-) suppr. tum., surv. immun.
<p>Abréviations : EBV, Epstein-Barr virus ; HBV, hepatitis B virus ; HTLV-1, human T-lymphotropic virus type 1 ; HR HPV, high-risk human papillomaviruses ; HCV, hepatitis C virus ; KSHV, Kaposi's sarcoma herpesvirus ; MCV, Merkel cell polyomavirus ; db /sb, double/simple brin ; EBNA, EBV nuclear antigen ; LMP, latent membrane protein ; EBERs, EBV-encoded small RNAs ; HBx, HBV-encoded X antigen ; HBZ, HTLV-1 basic leucine zipper ; E, early ; NS, non structural ; LANA, latency-associated nuclear antigen ; vFLIP, viral homolog of Fas-associated death domain-like IL-1β-converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein ; vGPCR, viral G-protein coupled receptor ; vIRF, viral IFN regulatory factor ; biosynth., voies de biosynthèse ; prolif., voies de prolifération ; suppr. tum., suppresseurs de tumeur ; immort., immortalisation ; infl., inflammation ; néoang., néoangiogenèse ; migr., migration ; int. gén., intégrité génomique ; surv. immun., surveillance immunitaire.</p>							

Chapitre II : HTLV-1 et cancer

I. Histoire et épidémiologie

A. Découverte du premier rétrovirus oncogène humain

Après la découverte du RSV, le premier rétrovirus oncogène animal, il fallut attendre celle de la transcriptase inverse (TI), une ADN polymérase ARN-dépendante d'origine virale, pour enclencher la recherche de rétrovirus chez l'homme (Coffin, 2015). C'est dans ce contexte que l'équipe du Dr. Gallo isola, en 1980, le premier et unique rétrovirus oncogène humain connu à ce jour : le HTLV-1 (Poiesz et al., 1980). Dix ans après la découverte de la TI, la mise au point des techniques de détection et de purification des virus, ainsi que la possibilité de maintenir des cellules T en culture, permirent également d'identifier d'autres rétrovirus humains non oncogènes : HIV-1, HIV-2, HTLV-2, HTLV-3, et HTLV-4 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Clavel et al., 1986; Gallo, 2005; Mahieux and Gessain, 2011; Popovic et al., 1984).

En parallèle, dès 1977, une forme singulière de leucémie à cellules T de l'adulte, appelée ATL pour « adult T-cell leukemia », avait été rapportée au Sud-Ouest du Japon (Uchiyama et al., 1977). Là encore, la génération d'une lignée cellulaire T, à partir de cellules ATL, permit aux chercheurs Japonais d'isoler le rétrovirus ATL (Hinuma et al., 1981; Miyoshi et al., 1981). Rapidement, il s'avéra que ATL et HTLV-1 n'étaient qu'un seul et même virus, et la dénomination HTLV-1 fut adoptée par la suite (Popovic et al., 1982; Watanabe et al., 1984). Finalement, la relation de causalité entre l'ATL et le virus HTLV-1 fut clairement établie après la démonstration (i) de sa capacité à immortaliser des cellules T *in vitro* et à induire une réponse humorale spécifique chez les patients ATL, et (ii) de son intégration monoclonale au sein du génome des cellules ATL (Takatsuki, 2005). De même, l'infection par HTLV-1 fut associée à l'étiologie d'une affection sévère et progressive du système nerveux central, appelée paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM) (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986), et d'autres maladies inflammatoires plus rares, telles que des uvéites et des dermatites infectieuses (Bittencourt and de Oliveira, 2010; Lee and Schwartz, 2011; Takahashi et al., 2000).

B. Distribution géographique et modalités de transmission

L'estimation globale du nombre d'individus infectés par HTLV-1 est biaisée à cause du manque d'études épidémiologiques menées par population et de données venant de certains pays densément peuplés comme la Chine, l'Inde, le Maghreb, et l'Est de l'Afrique. De plus, le virus est essentiellement concentré au niveau de régions spécifiques du sud-ouest du Japon, d'Afrique sub-Saharienne, d'Amérique du Sud, des Caraïbes, du Moyen-Orient, d'Australie, et de Mélanésie. Dans ces zones, dites de forte endémie, la séroprévalence minimale est de 1 à 2% et peut atteindre les 40% au sein de certaines communautés, chez les personnes de plus de 50 ans. De manière générale, la séroprévalence y est plus élevée chez les femmes et augmente avec l'âge, indépendamment du contexte socio-économique ou culturel. Ainsi, une étude conduite en 2012 fait état d'un minimum de 5 à 10 millions de porteurs à travers le monde, seulement en se basant sur des informations collectées dans les zones endémiques (soit 1,5 milliard d'individus au total) et principalement chez des femmes enceintes, des donneurs de sang, et des patients hospitalisés (Gessain and Cassar, 2012) (Figure 1).

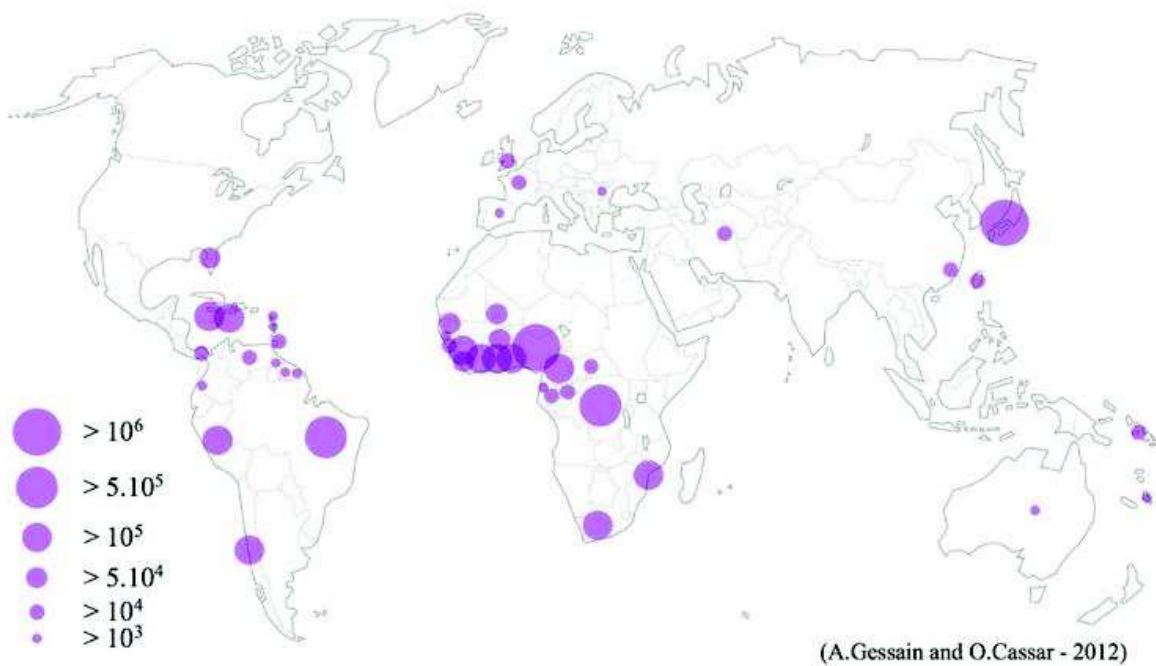


Figure 1 : Principaux foyers d'infection par HTLV-1 (Gessain and Cassar, 2012). Estimation du nombre de personnes infectées par HTLV-1 dans le monde.

HTLV-1 étant peu infectieux à l'état de virion libre, la transmission du virus d'un individu à l'autre requiert l'exposition à des liquides biologiques contenant des cellules infectées (produits sanguins, sperme, sécrétions vaginales, lait maternel). Parmi les trois principaux modes d'infection répertoriés pour HTLV-1, la voie sanguine (ou parentérale) est la plus efficace avec une séroconversion observée chez 15 à 60% des patients dans les 2 mois après transfusion (Inaba et al., 1989; Okochi et al., 1984). La transmission sexuelle, quant à elle, est beaucoup moins aisée et nécessite des contacts répétés (Roucoux et al., 2005). Enfin, la transmission de la mère à l'enfant (voie verticale) a lieu chez 10 à 25 % des enfants allaités sur une période de plus de 6 mois. Les autres facteurs de risque sont un fort titre d'anticorps dirigés contre le virus et une charge provirale élevée dans le sang et le lait de la mère (Hino, 2011; Ureta-Vidal et al., 1999). L'allaitement constitue l'un des principaux facteurs de risque pour le développement d'une ATL à l'âge adulte (Wilks et al., 1996).

C. La leucémie à cellules T de l'adulte

Il existe 7 sous-types moléculaires du HTLV-1 (ou génotypes), principalement définis par leur situation géographique. Cependant, HTLV-1 conserve une grande stabilité génomique et ces quelques substitutions nucléotidiques ne semblent pas être déterminantes dans le type de pathologie développée (Gessain and Cassar, 2012). Bien que les cas d'ATL soient principalement rencontrés dans les zones de forte endémie du virus, la maladie ne se déclare que chez 1 à 5% des individus infectés, après une longue période de latence, suggérant l'intervention de cofacteurs de l'hôte et/ou environnementaux (Iwanaga et al., 2012).

Effectivement, les personnes infectées par HTLV-1 alors qu'ils étaient enfants (en général suite à un allaitement prolongé) ont plus de chances de développer une ATL et ce, 40 à 60 ans après la primo-infection (Murphy et al., 1989; Wilks et al., 1996). De plus, le risque d'ATL semble être 2 à 3 fois plus important chez les hommes et chez les patients ayant des antécédents familiaux de cancer lymphoïde (Iwanaga et al., 2012). Certains facteurs génétiques de l'hôte ont d'ailleurs été proposés. C'est le cas de certains allèles de gènes du système

d'histocompatibilité HLA (human leucocyte antigen) dont la présence favoriserait la survenue d'une ATL (Yashiki et al., 2001). L'immunosuppression, fréquente chez les patients infectés par HTLV-1, conditionnerait également l'émergence et la sévérité de l'ATL. Ainsi, la co-infection avec le parasite *Strongyloides stercoralis* accélérerait le processus leucémogène (Gabet et al., 2000; Iwanaga et al., 2012).

L'ATL se caractérise par la prolifération agressive et monoclonale de lymphocytes T CD4⁺ infectés, essentiellement de type effecteur/mémoire et Foxp3⁺ (Miyazato and Matsuoka, 2014). Le diagnostic se fait suite à la détection d'anticorps sériques dirigés contre HTLV-1 et de cellules ATL, dont la morphologie est atypique (noyau polylobé en forme de fleur). L'apparition de certains signes cliniques permet de définir 4 sous-types d'ATL, de gravité croissante : rampant, chronique, lymphomateux, et leucémique (Shimoyama, 1991). Les formes dites aiguës (lymphomateuse et leucémique) sont majoritaires et conduisent au décès du patient en quelques mois. Les solutions de traitement sont multiples (surveillance médicale, combinaison d'antiviraux, chimiothérapie intensive, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, anticorps monoclonaux) et diffèrent selon le sous-type clinique et son avancée (Kato and Akashi, 2015). Toutefois, il n'existe pas de traitement vraiment satisfaisant à ce jour et le pronostic vital des patients reste funeste, même pour les formes moins agressives d'ATL.

II. Le rétrovirus complexe HTLV-1

A. Structure générale

L'agent étiologique de l'ATL a été classé par l'ICTV (international committee on taxonomy of viruses) dans la famille des *Retroviridae*, la sous-famille des *Oncoretrovirinae* et le genre des *Deltaretrovirus*. Ce virus enveloppé, d'apparence sphérique (environ 100 nm de diamètre), renferme une capsidie icosaédrique qui protège 2 copies d'ARN génomique (ARNg) simple brin linéaire, ainsi que des protéines du virus nécessaires à son cycle répliatif (Verdonck et al., 2007) (Figure 2A). Après attachement et fusion avec la membrane plasmique de la cellule cible, la capsidie virale est libérée dans le cytoplasme. S'en suivent la décapsidation et transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin ou ADNc (ADN complémentaire), et son intégration aléatoire au sein du génome de la cellule hôte : on parle alors de provirus (Martin et al., 2016).

B. Organisation génomique

La séquence nucléotidique complète des 9032 pb (paire de bases) du génome proviral est disponible depuis 1983. Comme tout rétrovirus, elle comprend des gènes codant pour des protéines structurales (Gag, Env) et enzymatiques (Pro, Pol) (Seiki et al., 1983). De plus, chacune de ses extrémités (5' et 3') est flanquée d'une séquence LTR de 755 nucléotides (nt), impliquée dans l'intégration, la répliation et l'expression du provirus (Seiki et al., 1983; Temin, 1982). Cependant, HTLV-1 est un rétrovirus qualifié de complexe car, en 3' de son génome proviral, 4 cadres de lecture ouverts (ORF pour « open reading frame ») supplémentaires ont été identifiés. A partir de cette région pX, l'utilisation de mécanismes d'épissage alternatif ainsi que de codons initiateurs internes permet l'expression des protéines régulatrices et auxiliaires Tax, Rex, p21, p12 (p8), p13, et p30 (Figure 2B).

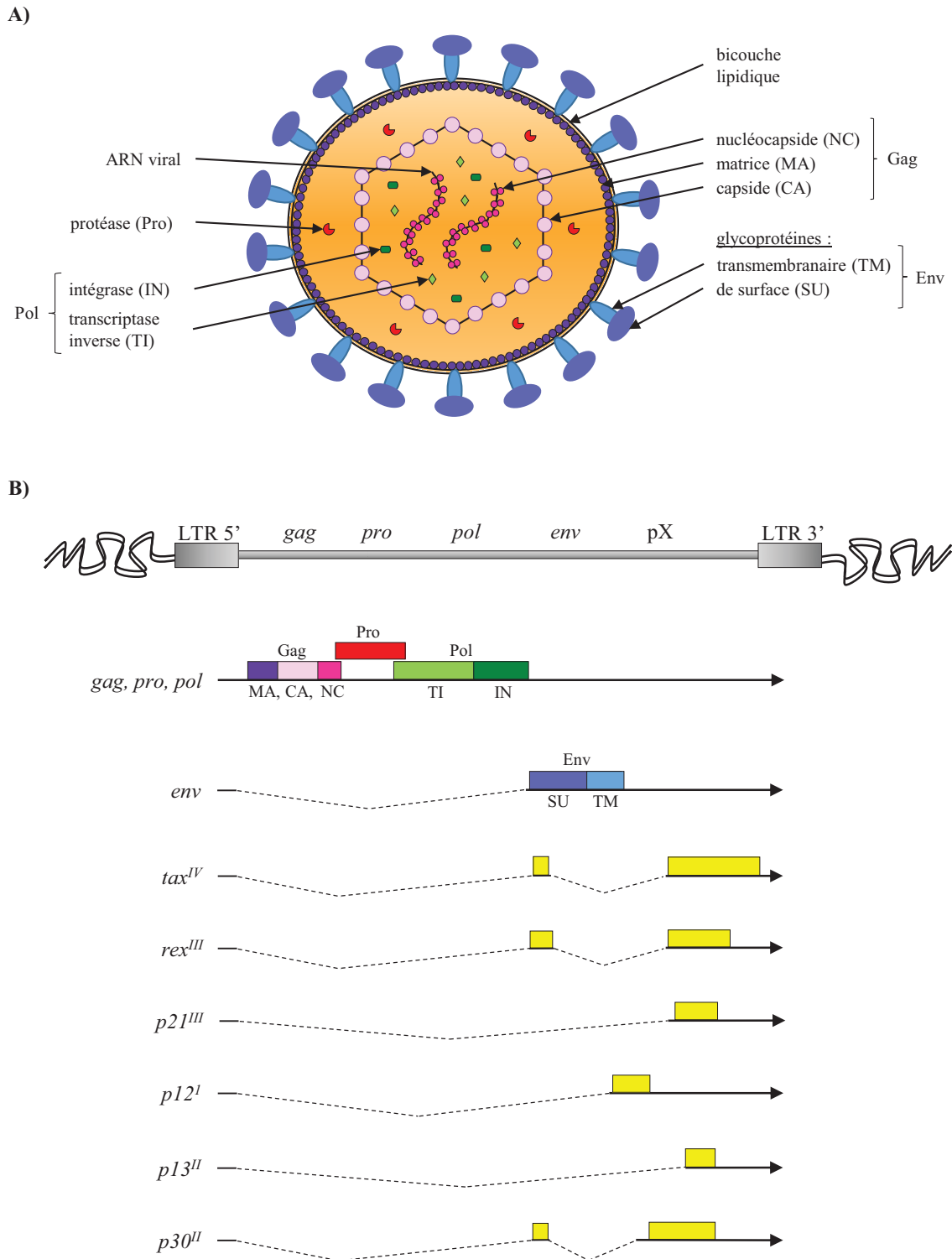


Figure 2 : Structure et génome du rétrovirus HTLV-1 (adaptée de Ma et al., 2016 ; Verdonck et al., 2007). (A) Représentation schématique de la structure et composition de la particule virale mature. L'enveloppe du virion comporte une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle s'insèrent les glycoprotéines SU et TM. La protéine MA permet l'organisation des composants viraux au niveau de la membrane interne de la cellule infectée. (B) Génome proviral, messagers et protéines du HTLV-1. Le provirus complet avec ses deux LTR est représenté (en gris) inséré au sein du génome cellulaire. En dessous, figurent les ARN messagers et protéines exprimés à partir du LTR5' (long terminal repeat) du génome proviral (les flèches indiquent le sens de transcription, les lignes pleines représentent les exons épissés, et les pointillés, les introns). Les cadres pleins illustrent les protéines de structure (même couleurs qu'en (A)), régulatrices et auxiliaires ainsi produites (en jaune ; les chiffres romains précisent l'ORF utilisée).

1. Gènes structuraux et enzymatiques

Les gènes *gag*, *pro*, et *pol* sont chevauchants et s'expriment à partir d'un unique transcrit non épissé (Figure 2B). L'initiation de la traduction à partir du premier cadre de lecture génère p55, un précurseur de gag (group-specific antigen). Un décalage dans le cadre de lecture permet la production de la protéase virale (Pro). Cette dernière est responsable du clivage de p55 et de la libération subséquente des protéines de matrice (MA/p19), de capsidie (CA/p24), et de nucléocapsidie (NC/p15), lors de la maturation de la particule virale. Les enzymes, transcriptase inverse et intégrase (IN), sont également générées par clivage d'un autre précurseur, Gag/Pol. IN catalyse l'insertion, dans le génome cellulaire, de l'ADN proviral obtenu grâce à la transcriptase inverse, à partir de l'ARN viral simple brin.

Le gène *env* encode les glycoprotéines de surface (SU/gp46) et transmembranaire (TM/gp21) de l'enveloppe du virion à partir d'un transcrit mono-épissé (Figure 2B). SU est nécessaire à la reconnaissance et à l'interaction spécifique avec les récepteurs des cellules cibles, alors que TM est impliquée dans l'entrée de la capsidie virale après fusion entre les membranes virale et cellulaire. Ces deux protéines sont issues du clivage d'un précurseur glycosylé de Env (gp61) par la furine, une protéase cellulaire (Lairmore et al., 2012).

2. Gènes régulateurs de l'expression virale

a. Le gène *tax*

L'ORF IV de la région pX encode une phosphoprotéine de 40 kDa, Tax (transcriptional activator of pX region), issue de la traduction d'un ARNm doublement épissé (Figure 2B). Comme son nom l'indique, Tax est le principal activateur de la transcription virale à partir du LTR5' et joue donc un rôle crucial dans la réplication et la transmission du HTLV-1. En effet, cette protéine non structurale est majoritairement présente dans le noyau, au niveau de zones fortement actives transcriptionnellement, appelées corps nucléaires (NB pour « nuclear bodies ») (Semmes and Jeang, 1996). Tax étant incapable de lier l'ADN, il agit en recrutant des facteurs cellulaires de transcription et de remodelage de la chromatine au niveau du promoteur viral (Curren et al., 2012; Kashanchi and Brady, 2005).

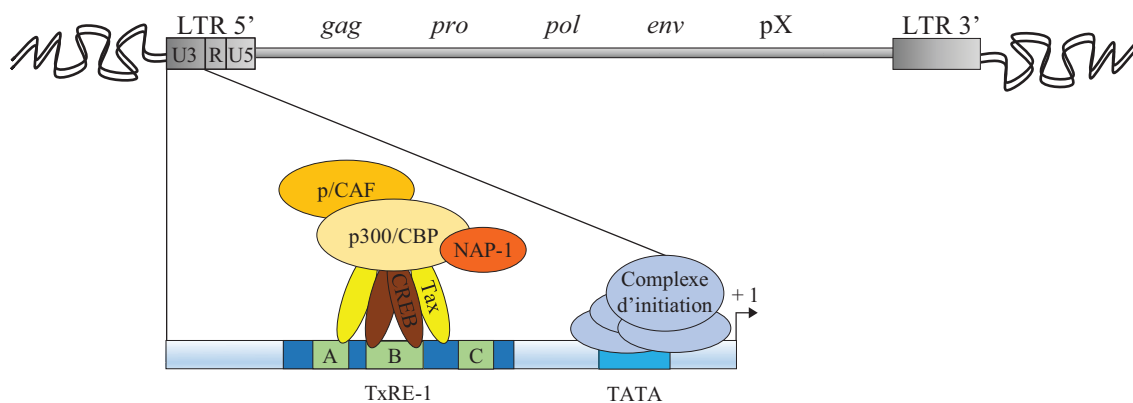


Figure 3 : Représentation schématique de la trans-activation du LTR5' par la protéine Tax du HTLV-1 (adaptée de Curren et al., 2012). Le TxRE-1 (Tax-responsive element) comprend un domaine B, homologue à CRE (cAMP-response element), et deux motifs, A et C, riches en G/C. Une fois le complexe Tax/CREB/TxRE-1 formé, Tax recrute des co-activateurs de la transcription (p300/CBP, p/CAF). p300/CBP coopère avec NAP-1, une chaperonne d'histones, pour induire le déplacement des nucléosomes acétylés de la chromatine et autoriser le recrutement de facteurs d'initiation de la transcription, tels que TBP (TATA binding protein) et l'ARN polymérase de type II, au niveau du promoteur viral. La flèche indique le site d'initiation de la transcription.

Les LTRs rétroviraux sont composés de 3 régions, orientées dans le sens 5' vers 3' : unique 3'(U3), répétée (R), et unique 5' (U5). C'est au niveau de la région U3 promotrice du LTR5' que se concentre l'effet de Tax. Elle comprend une boîte TATA ainsi que 3 éléments de réponse à Tax ou TxRE-1 (Tax-responsive element 1). Il existe 3 séquences TxRE-1 (TxRE-1 I, II, et III) de 21 pb chacune, organisées en 3 domaines : A, B, et C (Figure 3). Le domaine central B porte la quasi-totalité du motif vCRE. Ce dernier présente une forte homologie de séquence avec les sites de liaison de la protéine CREB (cAMP-response element (CRE) binding protein) et est le lieu du recrutement de dimères CREB/CREB ou CREB/ATF (activating transcription factor) par Tax sous forme homodimérique. L'association de CREB/CREB ou CREB/ATF au site vCRE est favorisée par leur interaction avec Tax et par la création de contacts entre Tax et les domaines A et C, riches en G/C, du TxRE-1. Suite à la formation du complexe Tax/CREB/TxRE-1, Tax recrute des co-activateurs de la transcription tels que p300/CBP (p300-CREB-binding protein) et p/CAF (p300/CBP-associated factor) qui, de par leur activité d'acétylation des histones (HAT pour « histone acetyltransferase »), vont contribuer à la décondensation de la chromatine. Enfin, l'expulsion des nucléosomes acétylés de la chromatine, au niveau du LTR viral, requiert l'intervention d'une chaperonne des histones, NAP-1 (nucleosome assembly protein 1), et du facteur BRG1 (Brahma-related gene 1) du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (switching-defective-sucrose non-fermenting). Ainsi, la région promotrice du génome proviral devient accessible aux composants de la machinerie transcriptionnelle, comme TBP (TATA binding protein) et l'ARN polymérase de type II (Pol II), et la transcription est alors initiée au niveau de la boîte TATA.

b. Le gène *rex*

Rapidement après l'infection, Tax active la transcription du génome proviral à partir du LTR5' dans le but de permettre la réplication du virus. Afin d'optimiser sa capacité de codage, le virus a recours, entre autres, à l'épissage alternatif de ses transcrits. De nombreuses protéines du virion sont donc produites à partir de transcrits non épissés (Gag, Pro, Pol) ou partiellement épissés (Env), alors que les protéines régulatrices et auxiliaires sont le résultat d'un mono-épissage (p21^{III}, p12^I, p13^{II}) ou d'un épissage complet (Tax, Rex, p30^{II}) (Figure 2B).

Rex est une phosphoprotéine de 27 kDa, encodée par le messenger *tax/rex*, dont le rôle dans l'infection et la pathogenèse induite par HTLV-1 a récemment fait l'objet d'une revue (Nakano and Watanabe, 2016). Avec Tax, elle est considérée comme le principal régulateur de l'expression virale. En effet, elle dispose en N-terminal d'un domaine de liaison à l'ARN, riche en Arginine, pour la reconnaissance spécifique d'une structure secondaire à 4 tiges-boucles (RxRE pour « Rex-responsive element »), présente au niveau des régions U3 et R du LTR3' de tous les messagers du HTLV-1. Ainsi, elle autorise l'export vers le cytoplasme des transcrits viraux pas ou partiellement épissés par la voie CRM-1 (chromosome maintenance 1) et, de ce fait, la traduction des protéines de structure du virion Gag, Pro, Pol, et Env. Rex est donc un acteur central de la réplication virale (Nakano and Watanabe, 2016). En outre, Rex régule le passage de phase productive à latence virale. Dès le début de l'infection, Rex favorise l'export des messagers structuraux aux dépens de celui de *tax/rex*, conduisant à la réduction des quantités disponibles en protéines Tax et Rex et donc de la production de virions. De plus, p30^{II} est connu pour séquestrer le transcrit *tax/rex* dans le nucléole, renforçant cet effet (Nakano and Watanabe, 2016). Cependant, Rex est capable d'induire la libération de *tax/rex* en interagissant avec p30^{II}. Aussi, l'état de la balance entre Rex et p30^{II} influencerait le passage de la phase de production virale active à la latence pour éviter la réponse immune (Sinha-Datta et al., 2007).

De nouvelles fonctions ont récemment été proposées pour Rex. Tout d'abord, Rex stabiliserait les ARNm non épissés (*ie.* ARNm et structuraux) du HTLV-1 et les protégerait de

la dégradation en inhibant la machinerie cellulaire NMD (nonsense-mediated mRNA decay). Cette dernière est responsable de la destruction des messagers cellulaires aberrants, évitant ainsi la production de protéines anormalement tronquées, et peut être induite suite à la détection de signaux présents sur les transcrits viraux. Par conséquent, le blocage du système NMD par Rex contribuerait à la réplication du HTLV-1 et dérégulerait, par la même occasion, l'expression de certains messagers cellulaires (Nakano et al., 2013). Ensuite, Rex serait impliqué dans la perturbation des mécanismes d'épissage (Nakano and Watanabe, 2016). Par exemple, en présence de Rex, l'expression du proto-oncogène Fyn, de la famille des tyrosines kinases membranaires, se trouve altérée. Lors de l'épissage de son messager, l'exon 7A serait préférentiellement conservé au lieu de l'exon 7B, générant l'isoforme cérébrale Fyn-B à la place de Fyn-T, normalement exprimée dans les cellules T (Weil et al., 1999). Il a été montré que l'ARNm de *FYN-B* est surexprimé dans des cellules de patients leucémiques (Picard et al., 2004). D'autre part, dans plusieurs lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1, l'expression de hnRNPA1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1), un régulateur négatif de l'épissage alternatif dans la cellule, est fortement diminuée (Dodon et al., 2002). De plus, Rex interagirait avec hnRNPA1 (Nakano, données non publiées). Aussi, on peut penser que Rex, en agissant sur la machinerie d'épissage, pourrait déréguler l'étape de maturation des transcrits cellulaires et donc l'expression de nombreux gènes (Nakano and Watanabe, 2016). Il a effectivement été montré que les lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1 présentent des profils d'épissage différents pour de nombreux messagers cellulaires et ce, en fonction du positionnement de la cellule dans le processus leucémogène (Thénoz et al., 2014).

Enfin, un variant tronqué en N-terminal de Rex, p21^{III}, est exprimé *in vivo* chez les patients infectés par HTLV-1, asymptomatiques ou ayant développé une ATL. Sa fonction reste indéterminée du fait de sa localisation uniquement cytoplasmique et de son incapacité à lier le motif RxRE (Nakano and Watanabe, 2016).

3. Gènes auxiliaires

A partir de la région pX du génome proviral, sont également exprimées les protéines p30, p13, p12 et p8. Leur rôle a longtemps été considéré comme négligeable dans l'infection par le HTLV-1, d'où le qualificatif de protéines « auxiliaires » ou « accessoires ». Il est maintenant admis quelles sont impliquées dans la réplication et la persistance virale *in vivo* et contribuent à la transformation cellulaire induite par HTLV-1 (Bai and Nicot, 2012).

a. Le gène *p30^{II}*

L'ORF II de la région pX encode p30, une protéine de 241 acides aminés, dont la localisation est nucléaire et nucléolaire (Anupam et al., 2013) (Figure 2B). p30 est nécessaire à la propagation du HTLV-1 chez le macaque, probablement du fait de sa capacité à stimuler l'infection et la réplication du virus dans les cellules dendritiques (DCs) (Valeri et al., 2010). Comme évoqué précédemment, p30 est surtout connu en tant que facteur de la latence virale, et peut agir à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Anupam et al., 2013).

A l'instar de Tax, p30 peut contacter le domaine KIX de p300/CBP et donc entrer en compétition avec Tax pour la liaison avec ces co-activateurs de la transcription. Ceci affecte le recrutement de p300/CBP par Tax au niveau des TxRE-1 et donc la trans-activation de l'expression provirale à partir du LTR5' (Zhang et al., 2001). De même, l'expression de plusieurs gènes cellulaires, régulant l'apoptose et l'activation des cellules T, est altérée du fait de l'interaction de p30 avec p300/CBP (Michael et al., 2004; Taylor et al., 2009). p30 est également capable de lier le facteur cellulaire PU.1 et d'inhiber son activité transcriptionnelle.

Ainsi, l'expression des récepteurs de type Toll-4 (TLR4) à la surface des macrophages infectés est réprimée, freinant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative contre HTLV-1 (Datta et al., 2006). L'action de p30 se situe aussi au niveau post-transcriptionnel, en altérant l'export nucléaire des transcrits néosynthétisés *tax/rex* et de nombreux messagers cellulaires (Nicot et al., 2004; Taylor et al., 2009).

D'autre part, p30 participe à la transformation de la cellule infectée. Par exemple, p30 joue sur le contrôle du cycle cellulaire en retardant l'entrée en phase S et le passage des phases G2 à M. De plus, p30 interfère avec la réparation des cassures double brin de l'ADN et favorise la recombinaison non-homologue. p30 promeut la prolifération de ces cellules (*i*) en interagissant avec l'oncoprotéine c-Myc, dont elle stimule l'activité transcriptionnelle et oncogénique, et (*ii*) en inhibant l'apoptose induite par c-Myc en cas de stress génotoxique (Anupam et al., 2013; Romeo et al., 2015).

b. Le gène *p13^{II}*

Toujours à partir de l'ORF II, un messenger mono-épissé génère la protéine p13 (Figure 2B), qui correspond aux 87 acides aminés de la région C-terminale de p30 (Koralnik et al., 1992). p13 est principalement localisé au niveau de la membrane interne des mitochondries (Ciminale et al., 1999; D'Agostino et al., 2002). En s'y insérant, p13 induit une dépolarisation, du fait de l'entrée d'ions K⁺, qui active la chaîne de transport des électrons et libère des radicaux libres oxygénés (ROS) (Biasiotto et al., 2010; Silic-Benussi et al., 2009, 2010a). Le niveau d'expression de p13, et donc la production de ROS, serait plus important dans les cellules transformées et induirait leur mort par apoptose. Au contraire, p13 stimulerait la prolifération des cellules T primaires infectées non transformées (D'Agostino et al., 2005; Hiraragi et al., 2005; Silic-Benussi et al., 2010b). La protéine p13 peut également être rencontrée dans le noyau, où elle entrerait en compétition avec p300/CBP pour la liaison à Tax, et interférerait avec la trans-activation de l'expression virale par Tax (Andresen et al., 2011). Toutefois, le rôle de p13 dans l'infection par HTLV-1 reste à clarifier.

c. Le gène *p12^I*

L'ORF I encode une protéine hautement hydrophobe de 99 acides aminés (aa), p12, qui est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. p12 subit deux clivages protéolytiques : un premier au niveau de RE entre les aa 9-10, puis un second au niveau du Golgi (aa 29-30). Les 70 aa restants constituent la protéine p8, qui sera exprimée à la surface de la cellule infectée et aura des fonctions différentes de son précurseur p12 (Rosadas and Puccioni-Sohler, 2015).

Comme p30, p12 est nécessaire à la propagation du HTLV-1 chez le macaque, mais pas chez le lapin (Valeri et al., 2010). Elle est impliquée dans l'échappement au système immunitaire, l'activation des cellules T infectées et leur prolifération (Rosadas and Puccioni-Sohler, 2015). En effet, p12 protège les cellules infectées de la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) en interférant avec la production des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) dans le RE, et donc avec la présentation d'antigènes à la membrane plasmique (Johnson et al., 2001). p12 réprime aussi l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire ICAM-1 et ICAM-2 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ infectés, empêchant leur destruction par les cellules NK (natural killer) (Banerjee et al., 2007).

La prolifération des cellules T primaires repose sur la présence dans le milieu d'une cytokine, l'interleukine-2 (IL-2). Au cours du processus de transformation, les cellules infectées

par HTLV-1 vont s'affranchir de cette dépendance en stimulant leur propre production d'IL-2. p12 y participerait, en activant la voie JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) et en induisant la libération de calcium par le RE, conduisant à l'activation de la voie NFAT (nuclear factor of activated T cells) ainsi qu'à l'activation des cellules T quiescentes (Rosadas and Puccioni-Sohler, 2015).

La protéine p8 joue un rôle dans la transmission virale et l'échappement au système immunitaire. Lors de l'interaction entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigène, il y a formation d'une synapse immunologique. Il a été montré que, suite à l'activation du récepteur de la cellule T (TCR), p8 est recrutée au niveau de la synapse immunologique et inhibe la transduction des signaux du TCR, réprimant indirectement l'expression virale (Fukumoto et al., 2007). De plus, p8 organise le regroupement à la membrane plasmique des molécules LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), constitutives de la synapse immunologique. Ainsi, p8 renforcerait l'attachement entre les cellules T, et favoriserait la transmission cellule-cellule de virions (non détectables par le système immunitaire), par le biais de conduits cellulaires et de synapses virologiques (explicité dans la partie III.A.2.) (Van Prooyen et al., 2010). Finalement, p8 et p12 seraient toutes deux nécessaires à l'évitement de réponse cytotoxique et donc à la persistance du virus HTLV-1 (Pise-Masison et al., 2014).

III. Les étapes clefs de la leucémogénèse induite par HTLV-1

A. La primo-infection

1. Tropisme

In vivo, le rétrovirus HTLV-1 cible préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ (Richardson et al., 1990). Néanmoins, l'infection d'une grande variété de types cellulaires a été rapportée, incluant les lymphocytes B et T CD8⁺, les monocytes, les DCs, et les macrophages (Jones et al., 2008; Koyanagi et al., 1993; Macatonia et al., 1992; Nagai et al., 2001).

L'entrée du virus est conditionnée par l'interaction entre la protéine SU de l'enveloppe virale et différents récepteurs cellulaires de surface. L'attachement de la particule virale à la cellule cible se fait par la liaison de composants de la matrice extracellulaire (MEC), les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG). Ces derniers recrutent NRP-1 (neuropiline-1) et permettent son interaction avec SU. Le complexe ainsi formé subit alors un changement de conformation, qui autorise le recrutement d'un transporteur ubiquitaire du glucose, GLUT-1, et initie la fusion entre les membranes cellulaire et virale. Contrairement à HSPG et NRP-1, GLUT-1 jouerait plutôt un rôle dans l'étape de fusion (Jones et al., 2011; Maeda et al., 2015).

Cependant, de nombreux types cellulaires infectés par HTLV-1 n'expriment pas ou peu certaines de ces molécules et requièrent l'intervention d'autres récepteurs (Rizkallah et al., 2015). C'est le cas du récepteur DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin), une lectine de type C, qui serait nécessaire à l'infection des DCs et à la transmission du virus aux lymphocytes T CD4⁺ (Ceccaldi et al., 2006; Jain et al., 2009).

2. Transmission par contact cellule-cellule

Contrairement au HIV-1, les particules virales libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées par HTLV-1 sont peu infectieuses et leur transmission est 10 000 fois plus efficace par le biais de contacts entre cellule infectée et cellule cible (Derse et al., 2004; Mazurov et al., 2010). De plus, leur enveloppe est facilement déstabilisée dans les milieux

biologiques, quelle que soit leur température (Shinagawa et al., 2012). Enfin, le virus doit franchir la barrière biologique, constituée par les cellules de l'épithélium muqueux oral, gastro-intestinal ou cervical, sauf dans le cas de la transmission par voie parentérale (Carpentier et al., 2015).

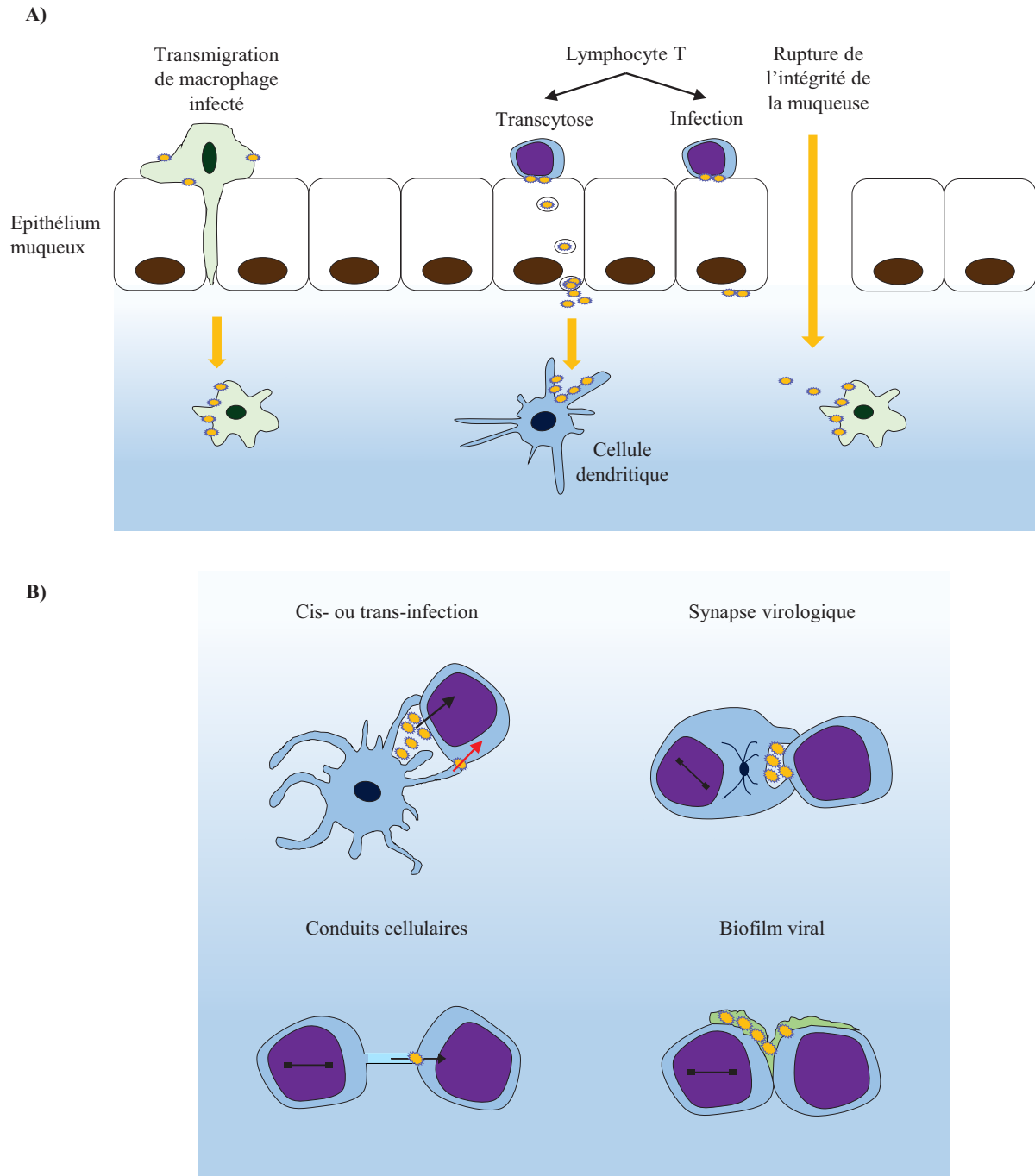


Figure 4 : Modélisation de la primo-infection par HTLV-1 (adaptée de Carpentier et al., 2015 ; Gross and Thoma-Kress, 2016 ; Rizkallah et al., 2015). (A) Mécanismes permettant le passage des muqueuses, suite à la transmission du virus par allaitement ou par contact sexuel. (B) Voies de transmission cellule-cellule du virus. Les cellules dendritiques peuvent transmettre le virus aux lymphocytes T de deux façons : (i) par cis-infection (en rouge), lorsqu'elles sont infectées de manière productive, ou par (ii) trans-infection (en noir), c'est-à-dire par le transfert passif de virions captés dans le milieu extracellulaire, sans infection préalable.

Outre le passage à travers un épithélium endommagé, plusieurs mécanismes ont été proposés : la transmigration de macrophages infectés, la traversée épithéliale de virions dans

des vésicules intracellulaires du pôle apical vers le pôle basal (transcytose), ou encore l'infection productive des cellules épithéliales (Figure 4A). Une fois la barrière épithéliale franchie, le virus va pouvoir infecter et se répliquer au sein des cellules T de l'épithélium sous-muqueux ou des organes lymphoïdes secondaires. La transmission se fait directement entre les cellules T CD4⁺ ou par le biais de cellules présentatrices d'antigènes, telles que les DCs. Les trois principaux mécanismes permettant la transmission de virions d'un lymphocyte infecté vers un lymphocyte non infecté, tout en évitant le système immunitaire, sont les suivants : la synapse virologique, les conduits cellulaires, et le biofilm viral (Figure 4B).

Brièvement, **la synapse virologique** se caractérise par la formation d'une fente synaptique, à la jonction entre les deux lymphocytes, et le bourgeonnement de particules virales au sein de cet espace protégé (Figure 4B). Pour cela, la cellule infectée encours un remodelage de son cytosquelette, avec la polarisation de son centre organisateur des microtubules (MTOC) et la relocalisation subséquente du génome viral ainsi que des protéines Gag et Env au pôle de la cellule (Igakura et al., 2003; Majorovits et al., 2008). La jonction intercellulaire est stabilisée par l'interaction entre les molécules de surface ICAM-1 et LFA-1. La formation de la synapse virologique fait également intervenir les protéines Tax et p8. Tax est impliqué dans la migration de la cellule infectée et travaille en synergie avec ICAM-1, dont il stimule l'expression, pour la réorganisation du cytosquelette (Gross and Thoma-Kress, 2016). p8 permet le regroupement à la membrane plasmique des molécules LFA-1, ce qui stabiliserait la synapse virologique. p8 peut également être transféré à la cellule saine *via* des conduits cellulaires (Van Prooyen et al., 2010).

Les conduits cellulaires sont de fines extensions de membrane plasmique, supportées par la polymérisation d'actine filamenteuse et pouvant être établies entre deux conduits ou bien entre un conduit et une cellule cible (Figure 4B). La présence de particules virales au niveau de ces contacts cellulaires a été observée en microscopie électronique à transmission. De plus, les protéines Gag et p8 ont été détectées dans ces conduits et l'expression de p8 s'accompagne de l'augmentation du nombre de conduits et de leur longueur (Van Prooyen et al., 2010). Etant donné l'impact de p8 sur la localisation de la molécule d'adhésion LFA-1, ces conduits permettraient de renforcer les contacts intercellulaires et de transmettre des virions à la cellule saine *via* la formation de mini-synapses virologiques. p8 ayant également un rôle inhibiteur sur la réponse immune, son transfert aux lymphocytes T sains induirait leur anergie (Gross and Thoma-Kress, 2016).

Afin de se répliquer dans le milieu extracellulaire, à l'abri du système immunitaire, les bactéries ont développé une niche protectrice, appelée biofilm. En 2010, l'existence de structures équivalentes a été démontrée à la surface des cellules infectées par HTLV-1 (Pais-Correia et al., 2010) (Figure 4B). Ces **biofilms viraux** sont le résultat de l'accumulation spécifique, au niveau de la membrane plasmique, de certaines protéines glycosylées de la MEC, d'agrine HSPG, ainsi que d'autres protéines cellulaires, comme la galectine-3, la téthérine, et des récepteurs de surface (CD43, CD45, CD4, CD25, CD150, CD70, et CD80) (Mazurov et al., 2012; Pais-Correia et al., 2010; Tarasevich et al., 2015). La téthérine est bien connue en tant que facteur de restriction de la transmission du rétrovirus HIV-1. Dans le cas du HTLV-1, elle permet de concentrer les virions au sein des biofilms sans pour autant gêner leur transmission (Ilinskaya et al., 2013). La dissociation chimique ou mécanique de ces structures réduit de manière drastique la capacité des cellules infectées à transférer les virus. Les biofilms viraux sont donc un moyen particulièrement efficace d'infecter d'autres cellules saines, même lors de bref contacts (Rizkallah et al., 2015). Ceci a été démontré dans le cas des cellules dendritiques, qui constituent une exception parmi les monocytes car pouvant être infectées par HTLV-1 de manière productive et transmettre le virus aux lymphocytes T CD4⁺ (Jones et al., 2008). En

effet, les DCs dérivées de monocytes (MDMC) sont plus sensibles à l'infection que les lymphocytes T CD4⁺, et ce en présence de biofilms viraux plutôt que de virions libres. Les lymphocytes T étant peu nombreux au niveau de l'épithélium sous-muqueux, les DCs pourraient constituer une cible préférentielle lors de la primo-infection par HTLV-1 et servir de réservoir pour la transmission du virus au niveau des muqueuses ou bien des organes lymphoïdes secondaires (Alais et al., 2015).

B. Réplication du HTLV-1 *in vivo* : l'expansion clonale

Chez les singes écureuils, il a été montré que 2 à 3 semaines après la primo-infection, la réponse immune contre HTLV-1 se met en place et la production virale devient indétectable. Pourtant, la charge provirale, c'est-à-dire le pourcentage de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ayant intégré le génome proviral du HTLV-1, reste élevée et augmente avec le temps, indiquant une forte réplication virale *in vivo* (Kazanji et al., 2000; Mortreux et al., 2001). Ainsi, la charge provirale peut atteindre les 1/25^{ème} des PBMC chez les porteurs asymptomatiques (ACs pour « asymptomatic carriers »), et dépasser les 1/5^{ème} des PBMC chez les patients atteints de TSP/HAM (Gessain et al., 1990; Kira et al., 1991; Shinzato et al., 1991; Wattel et al., 1992). Paradoxalement, la variabilité génétique du HTLV-1 à travers le monde et au sein d'un individu donné est particulièrement faible pour un rétrovirus (Gessain et al., 1992; Van Dooren et al., 2004). Ceci s'explique par une transmission préférentielle du HTLV-1 *in vivo* par expansion clonale (ou division mitotique) des cellules infectées, et donc l'emploi de l'ADN polymérase cellulaire, plus fidèle que la TI du fait de son activité de correction des erreurs (Mortreux et al., 2003). Le recours à l'expansion clonale aurait lieu très tôt après l'infection, car le traitement par des inhibiteurs de la transcriptase inverse ou de l'intégrase n'affecte en rien la charge provirale des patients infectés (Taylor et al., 2006; Treviño et al., 2012). Récemment, le suivi de patients, ayant contracté le virus suite à la transplantation d'un organe infecté, a permis de confirmer la rapide réplication du virus *in vivo* par expansion clonale (Cook et al., 2016).

L'expansion clonale se caractérise par la prolifération excessive de très nombreux clones (expansion polyclonale), de quelques clones (expansion oligoclonale), voire d'un seul clone (expansion monoclonale). L'ATL est le résultat de l'émergence d'un clone T CD4⁺ tumoral, caractérisé par l'insertion d'une seule copie (dans la grande majorité des cas) du génome proviral au niveau d'un site unique (Cook et al., 2014). Cependant, une grande diversité de clones de faible abondance persiste chez les patients et constitue une source potentielle de remplacement du clone majoritaire, rendant difficile le traitement de l'ATL de manière définitive (Bangham et al., 2014). Bien que chez les individus infectés par HTLV-1, la majorité des PBMC soit des lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T CD8⁺ représentent 5% de la charge provirale et encourent eux aussi une expansion clonale *in vivo*. Contrairement aux cellules T CD4⁺, l'expansion clonale des lymphocytes T CD8⁺ infectés génère moins de clones différents, mais ces derniers sont plus abondants et persistent dans le sang du patient (Melamed et al., 2015). Pourtant, il a été montré que seuls les lymphocytes T CD4⁺ présentent un phénotype pré-leucémique, avec dérégulation du cycle cellulaire, défaut de cytocinèse (cellules polynucléées et ponts chromatiniens), et instabilité génétique. L'augmentation du nombre de clones T CD8⁺ découlerait plutôt de leur résistance à l'apoptose et ne suffirait pas au développement d'une leucémie (Sibon et al., 2006).

C. Tax, un puissant initiateur de la transformation cellulaire induite par HTLV-1

1. Structure, localisation, et modifications post-traductionnelles de Tax

La prolifération clonale des lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1 et l'apparition d'un phénotype pré-leucémique découlent principalement de l'action de la protéine oncogène Tax. Outre son activité de trans-activation de l'expression virale, Tax dérégule de nombreuses voies de signalisation cellulaire, impliquées dans la prolifération, la survie, et le maintien de l'intégrité génomique. Pour cela, Tax module l'expression de gènes codant pour certains régulateurs de ces voies ou altère directement leur fonction en interagissant avec eux. Tax possède effectivement plusieurs domaines structuraux et fonctionnels, répartis le long de ses 353 aa, qui lui permettent d'interagir avec tout un panel de facteurs cellulaires (Boxus et al., 2008) (Figure 5).

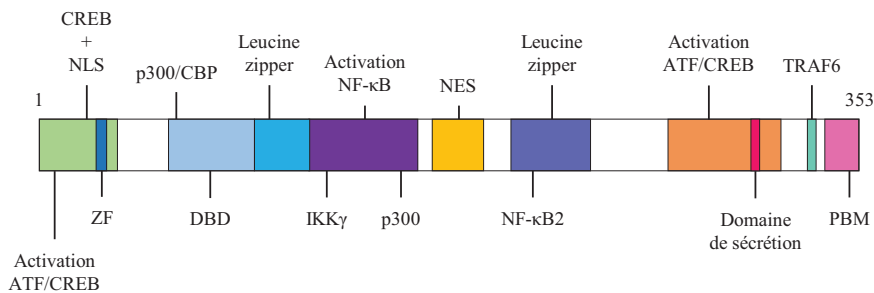


Figure 5 : Schématisation des domaines structuraux et fonctionnels de la protéine Tax du HTLV-1 (adaptée de Lavorgna and Harhaj, 2014 ; Romanelli et al., 2013). NLS, nuclear localization signal; ZF, zinc finger; DBD, DNA binding domain; NES, nuclear export signal; PBM, PDZ binding motif.

Dans sa partie N-terminale, Tax dispose d'un domaine de liaison à CREB pour son interaction avec les protéines de la famille ATF/CREB, telles que CREB, CREB-2 (ou ATF-4), CREM (CRE modulator), ATF-1, et ATF-2. Ce domaine est essentiel pour la trans-activation de l'expression virale par Tax. Le domaine en doigt de Zinc (ZF) permet l'association de Tax avec plusieurs facteurs de transcription, dont ATF/CREB. Ensuite, une région au sein du domaine de liaison à l'ADN (DBD) est impliquée dans le recrutement de p300/CBP par Tax. Les deux régions de type « leucine zipper » sont requises pour la formation des dimères de Tax, ainsi que pour leur interaction avec d'autres protéines cellulaires. En C-terminal, Tax présente un domaine de sécrétion responsable de son transport du RE vers le Golgi, puis vers la membrane plasmique pour une libération dans le milieu extracellulaire. Enfin, le motif PBM conditionne la liaison entre Tax et les protéines à domaine PDZ, comme le suppresseur de tumeur hDlg (homolog of *Drosophila melanogaster* disc larg). Enfin, un signal de localisation (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES) permettent à Tax de transiter entre le noyau et le cytoplasme de la cellule (Romanelli et al., 2013; Shirinian et al., 2013) (Figure 5).

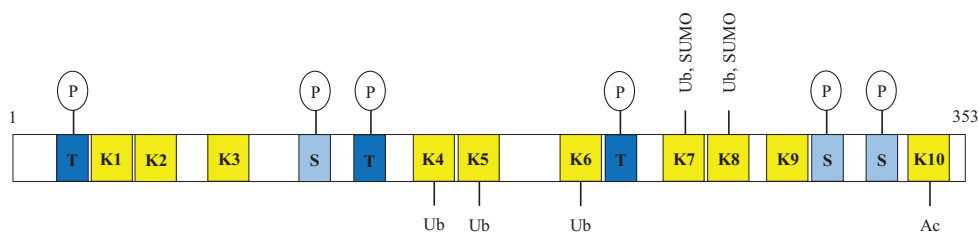


Figure 6 : Principales modifications post-traductionnelles de la protéine Tax du HTLV-1 (adaptée de Lavorgna and Harhaj, 2014 ; Shirinian et al., 2013). K, lysine ; S, sérine ; T, thréonine ; Ub, ubiquitination ; P, phosphorylation ; SUMO (small ubiquitin-like modifier), SUMOylation.

Dans le noyau, Tax induit la formation de corps nucléaires ou NBs, où son activité transcriptionnelle est fortement stimulée. A ce niveau, Tax interagit avec divers composants des machineries transcriptionnelle et d'épissage, ou encore de la voie NF- κ B (nuclear factor kappa B). Dans le cytoplasme, Tax est présent essentiellement au niveau des organelles de sécrétion, du MTOC, et des synapses virologiques établies entre cellule infectée et non infectée par HTLV-1. La localisation cellulaire de Tax dépend de son profil après ajout de modifications post-traductionnelles (Figure 6). Tax peut ainsi encourir phosphorylation, acétylation, ubiquitination, et SUMOylation, qui influent également sur le devenir de la protéine et sa fonction (Lavorgna and Harhaj, 2014; Shirinian et al., 2013). Par exemple, la mono-ubiquitination des lysines 280 (K7) et 284 (K8) de Tax conditionne son export du noyau vers le cytoplasme. Au contraire, la poly-ubiquitination de Tax *via* K48, c'est-à-dire par la polymérisation de molécules d'ubiquitine à partir de leur lysine 48, conduit à sa dégradation protéasomale dans la matrice nucléaire. Quant à sa poly-ubiquitination *via* K63, elle est favorisée en présence de Tax et contribue à l'activation de NF- κ B par Tax ainsi qu'à son interaction avec d'autres protéines au niveau du *cis*-Golgi. K7 et K8 peuvent également être SUMOylées. Cette modification est nécessaire à la formation des NBs induite par Tax sans pour autant affecter sa capacité à activer la voie NF- κ B (Lavorgna and Harhaj, 2014). De plus, Tax possède plusieurs sites de phosphorylation, les deux plus importants étant localisés au niveau de sa partie N-terminale. En effet, la phosphorylation des sérines 300 et/ou 301 permet le recrutement de Tax dans les NBs et l'activation subséquente des voies ATF/CREB et NF- κ B par Tax. Leur modification est aussi un prérequis à l'ubiquitination, la SUMOylation, et l'acétylation de Tax. Enfin, l'acétylation de Tax par p300 dans le noyau participerait à l'activation de la voie NF- κ B par Tax (Shirinian et al., 2013).

2. Modulation de nombreuses activités cellulaires par Tax

La protéine Tax est capable d'immortaliser des fibroblastes murins et des lymphocytes T primaires humains en présence d'IL-2 (Grassmann et al., 1989; Tanaka et al., 1990). De plus, chez des souris transgéniques, l'expression de Tax conduit à la formation de diverses tumeurs, pouvant se rapprocher plus ou moins de l'ATL selon le promoteur utilisé (Ohsugi, 2013). La protéine Tax est donc considérée comme l'un des principaux acteurs de la transformation cellulaire induite par le rétrovirus HTLV-1 (Grassmann et al., 2005; Matsuoka and Jeang, 2007). En effet, Tax promeut l'expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ infectés et initie leur transformation *via* la modulation de nombreuses activités cellulaires qui seront brièvement abordées dans cette partie, le rôle de Tax dans la transformation cellulaire n'étant pas le sujet de cette thèse.

a. Activation des voies de survie et de prolifération cellulaire

Tax stimule la prolifération lymphocytaire et leur résistance à l'apoptose en dérégulant les voies de signalisation ATF/CREB, SRF, NFAT, NF- κ B, PI3K/Akt, AP-1, TGF- β /Smad, Wnt, ainsi que celle des MAPK/JNK (Boxus et al., 2008; Carpentier et al., 2015). Ici, seules seront développées les interactions entre Tax et les voies NF- κ B et AP-1, deux voies de signalisation jouant un rôle clef dans l'expansion clonale.

i. Tax et la voie NF- κ B

La voie NF- κ B intervient dans la régulation des processus de survie et de prolifération cellulaire, ainsi que des réponses inflammatoires et immunitaires. Son activation est transitoire et implique la translocation nucléaire des dimères NF- κ B, constitués à partir des cinq facteurs de transcription suivants : p65 (RelA), RelB, c-Rel, et les protéines p50 et p52, issues

respectivement du clivage des précurseurs p105 et p100. En effet, dans les cellules T quiescentes, les dimères NF- κ B sont maintenus inactifs dans le cytoplasme du fait de leur interaction physique avec les protéines inhibitrices de NF- κ B (I κ B), telles que I κ B α , I κ B β , p105, et p100. Au contraire, lorsque la cellule perçoit certains stimuli activateurs, les protéines I κ B sont phosphorylées, ubiquitinées, et dégradées par le protéasome. Les dimères NF- κ B sont donc libres d'aller dans le noyau et d'induire ou de réprimer l'expression de tout un panel de gènes, présentant dans leur région promotrice un site de liaison κ B (Hayden and Ghosh, 2012) (Figure 7).

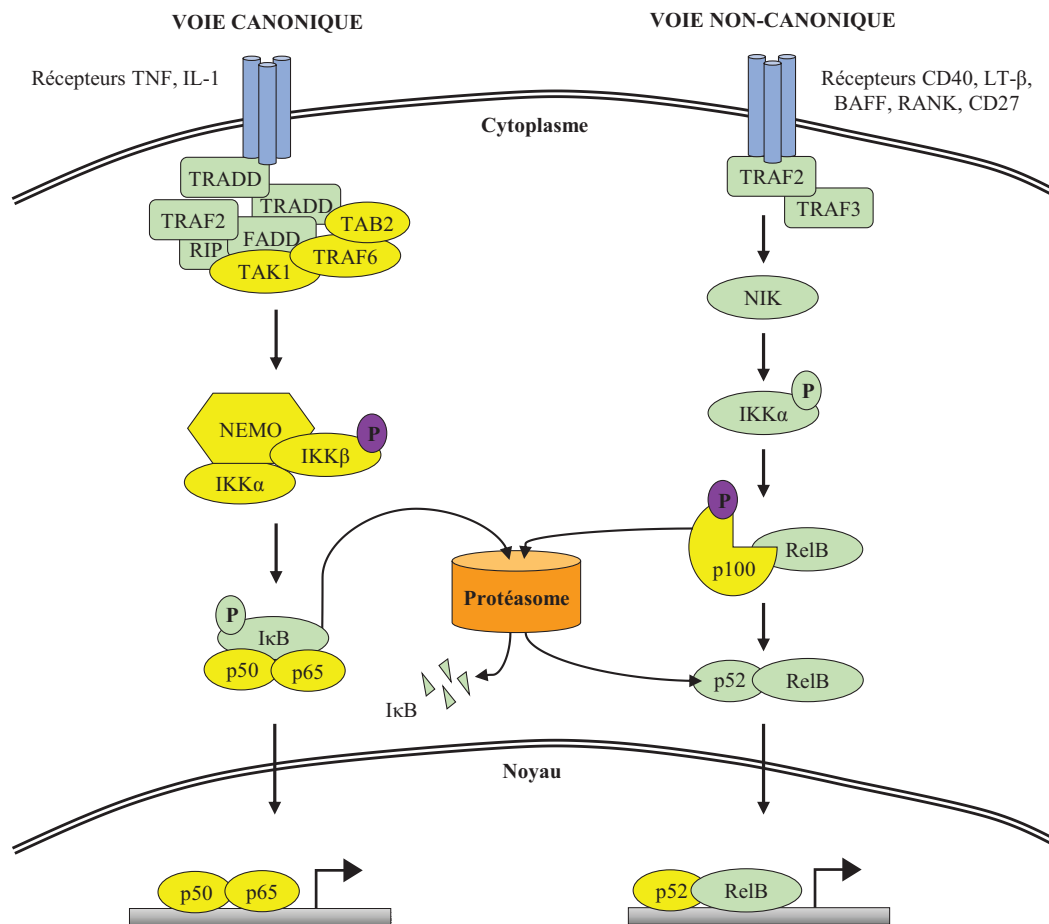


Figure 7 : Activation constitutive de la voie NF- κ B par la protéine Tax du HTLV-1 (adapté de Romanelli et al., 2013 ; Shirinian et al., 2013). Les principales composantes des voies canonique et non-canonique ciblées par Tax sont indiquées en jaune. BAFF, B cell activating factor of the TNF family ; FADD, Fas-associated death domain protein ; I κ B, inhibitor of NF- κ B ; IKK, I κ B kinase ; LT- β , lymphotoxin β ; MAP3K, mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase ; NEMO, NF- κ B essential modulator ; NIK, NF- κ B inducing kinase ; RANK, receptor activator of NF- κ B ; RIP, receptor-interacting protein ; TAB, TAK1-binding protein ; TAK, TGF- β activated kinase ; TNF, tumor necrosis factor ; TRADD, TNFR1-associated death domain protein ; TRAF, TNF receptor-associated factor.

Il existe deux types de voie NF- κ B : la voie canonique (ou classique), et la voie non-canonique (ou alternative) (Figure 7). La voie canonique est activée en présence de cytokines pro-inflammatoires (comme TNF et IL-1), de facteurs de croissance, d'agents génotoxiques, ou encore d'antigènes. Elle fait intervenir des protéines adaptatrices, telles que RIP1 ou TRAF6, pour recruter des MAP3K comme TAK1 et permettre l'activation du complexe IKK (I κ B kinase), composé de la sous-unité régulatrice NEMO (aussi appelée IKK γ) et de 2 sous-unités catalytiques, IKK α et IKK β . Ainsi, TAK1 phosphoryle la sous-unité IKK β et autorise de ce fait la phosphorylation des protéines I κ B et donc la translocation nucléaire des dimères NF- κ B,

constitués en général de p65 associé à un autre membre NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2012; Lavorgna and Harhaj, 2014). La voie non-canonique, quant à elle, contrôle plutôt l'expression de gènes impliqués dans la formation des organes lymphoïdes, la survie des cellules B, et le métabolisme osseux. Elle répond à certains ligands de la superfamille TNF et requiert la phosphorylation de la sous-unité IKK α par NIK, une autre MAP3K. Suite à sa phosphorylation par IKK α , p100 est clivé par le protéasome, permettant la génération d'hétérodimères actifs entre le facteur p52 ainsi obtenu et RelB (Sun, 2012).

La protéine virale Tax altère à différents niveaux les voies canonique et non-canonique de NF- κ B, conduisant à leur activation persistante (Peloponese et al., 2006) (Figure 7). Dans la voie canonique, Tax maintient l'activité du complexe IKK en (1) liant directement la sous-unité régulatrice NEMO, et en (2) stimulant la fonction des protéines cellulaires TRAF6, TAB2, TAK1, ainsi que MEKK1, un régulateur de TAK1. De plus, en interagissant avec les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β , Tax induit leur activation, sans nécessiter l'intervention des kinases MEKK1 ou TAK1, et favorise ainsi la dégradation des répresseurs I κ B. De même, dans la voie non-canonique, l'interaction de Tax avec NEMO autorise le recrutement et l'activation de IKK α , et donc le clivage de p100 en p52 *via* le protéasome, sans passer par la kinase NIK. Enfin, Tax induit la translocation de p65 du cytoplasme vers le noyau. Une fois dans le noyau, Tax interagit avec p65, mais aussi avec p50 et p52, et stimule leur activité transcriptionnelle en favorisant leur dimérisation et en recrutant les co-activateurs de la transcription p300/CBP et p/CAF (Kfoury et al., 2012).

Ainsi, en activant constitutivement la voie NF- κ B, Tax stimule l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération des cellules T infectées par HTLV-1. Par exemple, Tax augmente l'expression de facteurs anti-apoptotiques, tels que c-FLIP et certains membres de la famille Bcl-2, ainsi que de nombreuses cytokines. L'altération de la voie NF- κ B par Tax contribue également à l'inactivation du suppresseur de tumeur p53, qui joue un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, ou encore de la réparation de l'ADN (Carpentier et al., 2015). Paradoxalement, l'activation de NF- κ B par Tax peut aussi déboucher sur la sénescence et l'apoptose des cellules infectées (Ho et al., 2012; Zhi et al., 2011). Il est vrai que Tax étant fortement immunogène, son expression par la cellule infectée augmente considérablement le risque de reconnaissance et d'élimination par les lymphocytes T cytotoxiques (Hanon et al., 2000). Aussi, il a récemment été montré que Tax pourrait contribuer à la persistance de l'infection *via* la voie NF- κ B, en induisant la sénescence et l'apoptose ou bien la survie des cellules T, selon qu'elles sont engagées ou non dans le cycle cellulaire (Mizuguchi et al., 2016).

ii. Tax et la voie AP-1

La voie AP-1 (activator protein-1) répond à divers stimuli physiologiques ou pathologiques (facteurs de croissance et cytokines, signaux de stress ou oncogéniques, présence d'un agent infectieux) et participe au contrôle des processus de prolifération, différenciation, survie, inflammation, néoangiogenèse, et migration cellulaire. Elle agit sous forme de dimères, principalement établis entre les facteurs de transcription de type bZIP (basic leucine zipper) Jun (c-Jun, JunB, JunD, Δ JunD) et Fos (c-Fos, FosB, FosB2, Fra-1, Fra-2), *via* leur domaine « leucine zipper ». Grâce à leur région basique, les dimères Jun/Jun et Jun/Fos ainsi formés sont capables de lier l'ADN, au niveau des séquences consensus TRE (TPA-responsive element) et CRE. Quant aux homodimères Fos, ils sont trop instables pour s'associer à l'ADN. Les gènes ciblés, ainsi que l'intensité de la réponse AP-1, varient en fonction de la composition et de l'abondance des dimères AP-1, des modifications post-traductionnelles encourues, et de

l'interaction avec d'autres facteurs et cofacteurs de la transcription (Eferl and Wagner, 2003; Hess et al., 2004; Shaulian and Karin, 2001).

De par son interaction avec les facteurs cellulaires SRF, TCFs, p300/CBP, et p/CAF, Tax induit la transcription de gènes codant pour des protéines AP-1, même en l'absence de stimulus externe. De plus, Tax augmente l'activité de liaison des facteurs AP-1 à l'ADN, et donc leur activité transcriptionnelle. Par exemple, *via* l'activation persistante de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase), Tax stimule la phosphorylation de c-Jun et donc sa fonction (Hall and Fujii, 2005). Enfin, l'interaction de Tax avec PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) permet la phosphorylation d'Akt sur sa sérine 473 et l'induction subséquente de la voie AP-1 par Akt (Peloponese and Jeang, 2006). L'activation de la voie PI3K/Akt/AP-1 par Tax protégerait les cellules infectées de l'apoptose et stimulerait leur prolifération (Jeong et al., 2008; Peloponese and Jeang, 2006; Saito et al., 2010).

b. Inactivation des points de contrôle cellulaire et instabilité génétique

Tax induirait la prolifération en agissant aussi directement sur le cycle cellulaire, en accélérant la progression du cycle cellulaire et en favorisant l'entrée en phase S de réplication de l'ADN. Tax est capable d'activer certains complexes, formés entre cyclines et kinases dépendantes des cyclines (CDK), tels que cyclineD/CDK4/6. D'un autre côté, Tax inactive le suppresseur de tumeur Rb (retinoblastoma protein), permettant la libération du facteur de transcription E2F1, ainsi que plusieurs inhibiteurs de CDKs, comme les membres de la famille INK4. De plus, Tax altère les points de contrôle du cycle cellulaire au niveau des phases G1/S et G2/M. Par exemple, Tax inactive fonctionnellement le suppresseur de tumeur et régulateur de la transition G1/S, p53. Tax interfère également avec le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC) par Mad1 (mitotique arrest defect 1), active prématurément le complexe promoteur de l'anaphase APC/Cdc20, et provoque l'amplification des centrosomes en ciblant RANBP1 et TAX1BP2. Ceci conduit à l'aneuploïdie des cellules (perte ou gain de chromosome) ou à l'apparition de plusieurs noyaux. Finalement, les conséquences de l'intervention de Tax sur la régulation du cycle cellulaire sont l'hyper-réplication de l'ADN cellulaire et la génération d'instabilité génétique (Marriott and Semmes, 2005; Nicot, 2015).

Tax peut induire des dommages de l'ADN cellulaire de plusieurs manières. D'une part, l'hyper-réplication de l'ADN observée en présence de Tax s'accompagne de l'apparition de lésions de l'ADN, telles que des coupures double brin (DSBs). Ces lésions sont également le résultat de l'activation par Tax de la production intracellulaire d'oxyde nitrique et de ROS. D'autre part, Tax altère la réponse cellulaire suite à la détection des dommages causés à l'ADN. Cette réponse, plus communément appelée voie DDR (DNA damage response), consiste en l'arrêt transitoire du cycle cellulaire jusqu'à réparation de l'ADN et permet la survie de la cellule. Toutefois, si de graves lésions persistent, l'arrêt du cycle est maintenu et la cellule entre en sénescence ou en apoptose. Or, Tax est capable d'inhiber ou de séquestrer, au niveau des corps nucléaires, des protéines impliquées dans la voie DDR, telles que ATM, CHK1-2, et p53 (Boxus and Willems, 2012; Matsuoka and Jeang, 2011). De plus, Tax module les voies de réparation de l'ADN. Par exemple, Tax inhibe la réparation des coupures simple brin de l'ADN par excision de base (BER), et favorise celle des DSBs par recombinaison non homologue (NHEJ) (Nicot, 2015). Ainsi, Tax autorise la prolifération des cellules comportant des mutations génétiques et l'accumulation de ces anomalies au fil des divisions (Boxus and Willems, 2012).

c. Tax ne suffit pas au développement de l'ATL

La protéine Tax du virus HTLV-1 joue un rôle crucial, aussi bien dans les étapes d'infection que de transformation. Du fait de sa capacité à moduler de nombreuses activités cellulaires, Tax facilite l'acquisition de certaines caractéristiques tumorales par la cellule infectée : résistance à la mort cellulaire, indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, immortalisation, migration, dérégulation du métabolisme cellulaire, instabilité génétique et mutations (Mesri et al., 2014). Pourtant, l'expression de Tax ne suffit pas à transformer des lymphocytes T primaires humains en l'absence d'IL-2, et n'est plus détectée dans la majorité des cas d'ATL (Bellon et al., 2010; Kataoka et al., 2015; Takeda et al., 2004). Ceci suggère que Tax n'est pas nécessaire au maintien du phénotype tumoral, et que d'autres facteurs viraux interviennent dans le processus leucémogène (Matsuoka and Jeang, 2007). En effet, il a été montré que l'expression de Tax est défavorable à la persistance virale, du fait de la forte réponse cytotoxique mise en place par l'hôte (Rowan and Bangham, 2012). Aussi, le contrôle de l'expression de Tax conditionnerait l'échappement de la cellule infectée au système immunitaire et sa possible dérive en un clone ATL (Furukawa et al., 2001).

Plusieurs mécanismes, faisant intervenir des facteurs viraux et cellulaires, sont impliqués dans la suppression de l'expression de Tax et des autres gènes viraux, à partir du LTR5'. Ils incluent (i) l'accumulation de mutations génétiques au sein du génome proviral, conduisant à l'inactivation du gène *tax*, (ii) la délétion du LTR5', (iii) ou encore la répression de la transcription virale à partir du LTR5', par hyperméthylation de l'ADN et modification des histones (Fan et al., 2010; Furukawa et al., 2001; Koiwa et al., 2002; Miyazaki et al., 2007; Takeda et al., 2004; Tamiya et al., 1996; Taniguchi et al., 2005). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre II, les protéines p30 et p13 du HTLV-1 jouent également un rôle dans la réplication virale en ciblant Tax à différents niveaux. D'un autre côté, certains facteurs cellulaires ont directement été mis en cause. C'est le cas de C/EBP β (CAAT/enhancer-binding protein β), un facteur de type bZIP, qui empêche la liaison de Tax au niveau du LTR5', et donc réprime la trans-activation des gènes viraux (Hivin et al., 2004). De même, TCF1 et LEF1, deux facteurs de transcription de la voie canonique Wnt/ β -caténine, inhibent la transcription virale, ainsi que l'activation des voies NF- κ B et AP-1, en interagissant avec Tax (Ma et al., 2015). Les potentiels suppresseurs de tumeurs, HIC et I-mfa, altèrent également la fonction de Tax en induisant sa relocalisation dans le cytoplasme et sa dégradation (Kusano et al., 2015). La dégradation protéasomale de Tax est aussi induite par l'ubiquitine ligase E3 PDLIM2, qui stimule sa poly-ubiquitination *via* K48 (Yan et al., 2009). Enfin, la zone d'insertion du provirus au sein de génome cellulaire, et son orientation par rapport aux gènes voisins, seraient déterminantes quant à l'expression de *tax* et des autres gènes viraux nécessaires à la réplication du HTLV-1 (Melamed et al., 2013). Par conséquent, la protéine Tax se pose comme un facteur viral essentiel à l'initiation de la transformation cellulaire, mais pouvant compromettre la persistance de l'infection, et donc le développement de l'ATL, si son expression n'est pas maîtrisée.

D. HBZ, un nouvel acteur de la transformation cellulaire induite par HTLV-1

1. Découverte de la protéine antisens du HTLV-1

Depuis la caractérisation du HTLV-1 en 1980, les chercheurs ont concentré leurs efforts sur l'étude de Tax, pensant avoir identifié le principal moteur du développement de l'ATL. Ce n'est qu'en 2002, que l'équipe du Dr Mesnard a dévoilé l'existence d'une nouvelle protéine régulatrice, qualifiée d'« antisens » car codée par le brin complémentaire du génome proviral

(Figure 8A) (Gaudray et al., 2002). Pourtant, la possibilité d'une transcription antisens à partir du LTR3' du HTLV-1 avait déjà été suggérée en 1989, mais ignorée par la communauté scientifique car allant à l'encontre des dogmes de l'expression génique (Larocca et al., 1989). Finalement, la construction d'une banque d'ADNc, à partir de la lignée cellulaire MT-2 chroniquement infectée par HTLV-1, a permis d'identifier une protéine virale de type bZIP, nommée « HTLV-1 bZIP factor » (HBZ), capable d'interagir avec le domaine ZIP de CREB-2 en double hybride chez la levure. La présence d'HBZ, ainsi que son interaction avec CREB-2, ont ensuite été confirmées *in vivo* dans les lignées cellulaires MT-4 et C81-66, chroniquement infectées par HTLV-1. De plus, CREB-2 étant impliqué, en tant que membre de la famille ATF/CREB, dans la trans-activation du LTR5' par Tax, l'équipe du Dr Mesnard a montré que son interaction avec HBZ empêche sa liaison aux sites CRE et TxRE, et donc l'activation de la transcription virale en présence de Tax. Au vu de ces résultats, HBZ pourrait être *in vivo* un régulateur négatif de l'expression de *tax* et des autres gènes viraux à partir du LTR5' (Gaudray et al., 2002).

Contrairement à *tax*, le gène *hbz* ne présente pas de mutations abortives et le LTR3', responsable de sa seule expression, est conservé et spécifiquement hypométhylié (Fan et al., 2010; Koiwa et al., 2002; Miyazaki et al., 2007; Taniguchi et al., 2005). Une analyse récemment publiée dans « Nature Genetics » a montré que, sur un total de 426 clones leucémiques de patients infectés par HTLV-1, un seul de ces clones était encore capable de produire des transcrits à partir du LTR 5'. A l'inverse, la transcription antisens n'était absolument pas affectée, voire fortement activée (Kataoka et al., 2015). Il est intéressant de signaler qu'une fraction non négligeable des provirus perdent leur région 5' avant même d'être intégrés dans le génome des cellules T (Miyazaki et al., 2007). Il n'est donc pas surprenant qu'*hbz* soit détecté dans 100% des cas d'ATL (Fan et al., 2010; Kataoka et al., 2015; Miyazaki et al., 2007; Satou et al., 2006a). En outre, l'analyse cinétique de l'expression des gènes viraux, par PCR (polymerase chain reaction) en temps réel chez le lapin, montre une augmentation rapide et immédiate des transcrits *tax/rex* et *gag/pol* après infection mais une faible expression d'*hbz* (Li et al., 2009a). Deux semaines après infection, alors que la charge provirale croît malgré la mise en place de la réponse antivirale, l'expression de *tax/rex* et *gag/pol* diminue jusqu'à devenir indétectable. Concomitamment, l'expression d'*hbz* augmente en corrélation avec la charge provirale et se stabilise. Ces observations ont été confirmées par culture *ex vivo* de lymphocytes de patients TSP/HAM, avec une forte expression de *tax* et une faible expression d'*hbz* lors du premier jour de culture. Par contre, dès le deuxième jour, la tendance s'inverse et la transcription sens diminue au profit de l'antisens (Figure 8B) (Belrose et al., 2011). Il a également été montré que l'expression d'*hbz*, à l'inverse de celle de *tax*, corrèle avec la charge provirale et la progression de la maladie chez les patients atteints de TSP/HAM (Andrade et al., 2013; Saito et al., 2009; Usui et al., 2008).

En comparaison avec les autres protéines virales, HBZ déclenche une faible réponse immunitaire, aussi bien humorale que cellulaire (Enose-Akahata et al., 2013; Rowan et al., 2014; Shiohama et al., 2016; Suemori et al., 2009). Etant donné que son expression a lieu très tôt après l'infection et qu'elle se stabilise, à l'inverse de celle des autres gènes viraux, on peut supposer qu'*hbz* joue un rôle dans la persistance de l'infection et de ce fait dans le développement de l'ATL (Barbeau and Mesnard, 2011; Matsuoka, 2010).

a. Modalités d'expression du gène *hbz*

Le gène *hbz* est localisé dans la région pX du génome proviral, entre le gène *env* et le dernier exon du messenger de *tax* (Figure 8A) (Gaudray et al., 2002). Des analyses RACE (rapid amplification of cDNA ends) ont montré qu'il existe plusieurs sites d'initiation de la

transcription, au niveau des régions R et U5 du LTR3', et que les transcrits antisens portent deux sites donneurs d'épissage dans l'exon 1 d'*hzb*. Ces derniers sont à l'origine de la production de deux variants mono-épissés : SP1 (spliced RNA 1), et plus rarement, SP2. SP1 est détecté par « reverse transcriptase » PCR (RT-PCR) dans les lignées cellulaires MT-4 et C81-66 ainsi que dans certains clones dérivés de patients ATL, et dispose d'un codon AUG, initiateur de la traduction, en phase avec l'ORF d'*hzb* (Cavanagh et al., 2006). Contrairement à SP1, l'expression de SP2 est très faible, voire indétectable *in vivo*, et pourrait avoir lieu à partir d'un codon non-AUG situé dans l'exon 1 d'*hzb* (Cavanagh et al., 2006). Quant à la forme non épissée d'*hzb*, découverte en 2002, sa transcription est initiée au niveau du gène *tax* sur le brin complémentaire (Yoshida et al., 2008) (Figure 8A).

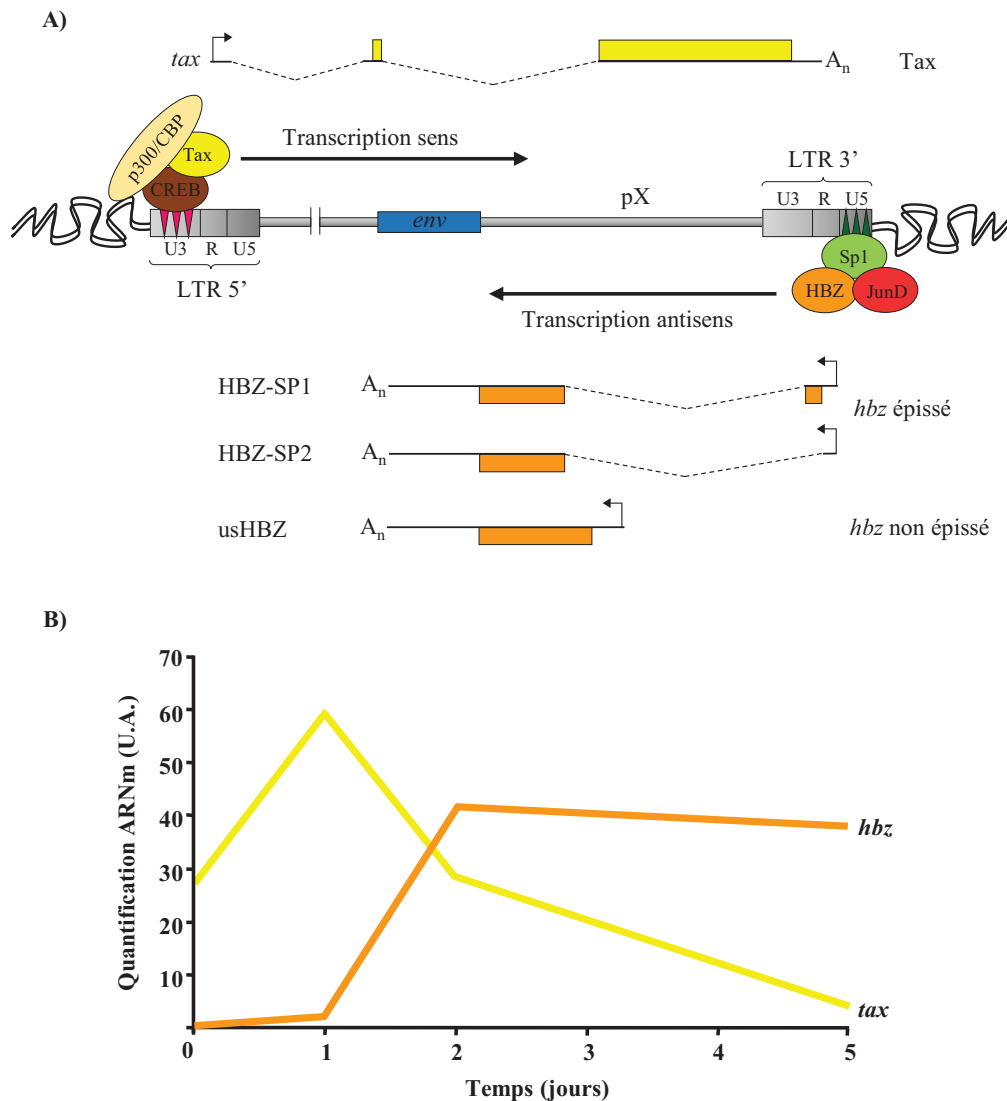


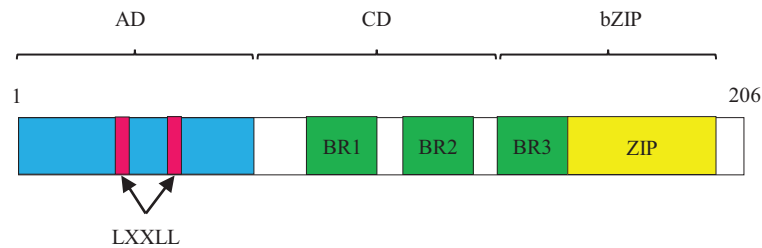
Figure 8 : Le génome proviral du HTLV-1 peut être transcrit en sens mais aussi en antisens, selon le stade de l'infection. (A) Régulation de l'expression des gènes *tax* et *hzb* à partir des LTR 5' et 3' du génome proviral. Les triangles roses et verts matérialisent respectivement les sites TxRE, activés par Tax, et les sites de liaison du facteur de transcription Sp1. A_n indique que les transcrits sont polyadénylés dans leur région 3'UTR (adapté de Matsuoka, 2010 ; Matsuoka and Yasunaga, 2013). (B) Quantification des messagers *tax* (en orange) et *hzb* (en jaune) dans des lymphocytes de patients TSP/HAM cultivés *ex vivo* (unité arbitraire (U.A.)) (adapté de Barbeau and Mesnard, 2011).

Lorsque l'on compare le transcrit non épissé d'*hzb* avec le variant majoritaire SP1, les seules différences notables se trouvent dans la région 5'UTR (untranslated region) et au début

de la séquence codante (Yoshida et al., 2008) (Figure 8A). Aussi, les protéines usHBZ (pour « unspliced HBZ ») et HBZ-SP1 présentent 95% d'identité et ne diffèrent que de quelques acides aminés dans leur partie N-terminale (Murata et al., 2006). Néanmoins, la quantité de transcrite non épissé est quatre fois plus faible que celle de SP1 chez les patients infectés par HTLV-1, asymptomatiques ou ayant développé une ATL (Usui et al., 2008). Ceci confirme l'observation d'une activité plus faible de son promoteur par rapport à celui de HBZ-SP1 (Yoshida et al., 2008). Au niveau protéique, l'isoforme usHBZ est moins abondamment produite en transfection dans des cellules 293T, et sa demi-vie est inférieure à celle d'HBZ-SP1 (Cavanagh et al., 2006; Yoshida et al., 2008). De plus, HBZ-SP1 est préférentiellement détectée par Immunoblot dans des lignées dérivées de cellules ATL, et a des effets beaucoup plus marqués sur la biologie de la cellule (Murata et al., 2006; Yoshida et al., 2008). C'est pourquoi, la majorité des études menées depuis 2006 portent sur la protéine HBZ-SP1 et son messenger. Il en va de même de cette thèse, dans laquelle il sera fait référence par défaut à la forme épissée majoritaire d'*hbz*, sauf précision contraire.

Les LTR 5' et 3' du HTLV-1 sont identiques et sont qualifiés de « bidirectionnels », car ils fonctionnent tous deux en sens et en antisens (Arpin-André et al., 2014). Il a été montré, à partir de cellules de patients ATL, que les facteurs et cofacteurs de la transcription (CREB, ATF-1, ATF-2, c-Fos, c-Jun, p300/CBP, TAF_{II}250 (TBP-associated factor), et Pol II) sont répartis de manière équivalente entre les régions promotrices U3 des deux LTR et que ces dernières sont transcriptionnellement actives (Lemasson et al., 2004). Aussi, Tax est capable de trans-activer l'expression d'*hbz* via CREB et les sites TxRE, présents dans la région U3 du LTR3', de manière plus ou moins marquée selon le site d'intégration du provirus au sein de l'ADN cellulaire (Landry et al., 2009; Yoshida et al., 2008). Cependant, Tax active préférentiellement la transcription sens et, en son absence, c'est la transcription antisens qui prévaut (Arpin-André et al., 2014; Laverdure et al., 2016). De plus, des expériences de délétion de certaines zones du LTR3' ont permis de localiser le promoteur d'*hbz* dans la région U5, suggérant l'intervention de facteurs autres que Tax/CREB (Yoshida et al., 2008). Effectivement, il n'y a pas de boîte TATA à proximité du promoteur d'*hbz* (Cavanagh et al., 2006; Yoshida et al., 2008). Par contre, trois boîtes riches en G/C ont été identifiées dans la région U5 et constituent des sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (specificity protein 1) (Yoshida et al., 2008). Ce dernier est exprimé de manière ubiquitaire et joue un rôle clef dans l'expression constitutive des gènes de ménage dépourvus de boîte TATA, via le recrutement des facteurs d'initiation de la transcription TBP/TFIID. Sp1 dispose de 3 motifs ZF de type C₂H₂ et de 4 domaines de trans-activation qui lui permettent de lier l'ADN et d'interagir avec une multitude de protéines cellulaires, tels que les facteurs de remodelage de la chromatine p300 et SWI/SNF (Wierstra, 2008). Sp1 régule également l'expression d'oncogènes et de suppresseurs de tumeur et interviendrait dans le développement tumoral (Beishline and Azizkhan-Clifford, 2015). Déjà en 1997, il avait été suggéré que Sp1 participerait au contrôle de la transcription basale du HTLV-1 (Barnhart et al., 1997). Depuis, il a été démontré que Sp1 est responsable de l'expression constitutive d'*hbz*, à partir des 3 sites Sp1 localisés dans la région U5 du LTR3' (Arpin-André et al., 2014; Yoshida et al., 2008). En fait, la présence de Sp1 au niveau du LTR3' autorise le recrutement d'un hétérodimère HBZ/JunD, JunD étant un facteur de transcription de type bZIP. Ainsi, HBZ stimule sa propre expression en coopérant avec JunD et Sp1 (Gazon et al., 2012) (Figure 8A).

b. Caractéristiques moléculaires de la protéine HBZ



Domaine d'HBZ	Cible cellulaire
AD	protéasome 26S, p300/CBP, GADD34, IRF1, Smad3
CD	LEF1, CENP-B, FoxP3, FoxO3a
bZIP	CREB, CREB2, ATF3, MafB, JunB, c-Jun, JunD
AD + CD	TCF1
AD + bZIP	C/EBP α
AD + CD + bZIP	p65
Indéterminé	Smad2, Smad4, NFAT

Figure 9 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine HBZ du HTLV-1 et de leur(s) cible(s) cellulaire(s) (adapté de Ma et al., 2016). AD, activation domain ; CD, central domain ; bZIP, basic leucine zipper domain ; BR, basic region.

HBZ est une protéine de 206 acides aminés, pouvant être subdivisée en trois principales régions qui conditionnent son interaction avec toute une variété de facteurs cellulaires : un domaine d'activation de la transcription (AD) en N-terminal, un domaine central (CD), et un domaine bZIP en C-terminal (Figure 9). Les 2 motifs de type LXXLL, positionnés en N-terminal, sont nécessaires à l'interaction entre HBZ et le domaine KIX de p300/CBP (Clerc et al., 2008; Cook et al., 2011). Le premier motif LXXLL est également requis pour l'activation par HBZ de la voie Smad3/TGF- β via p300 (Zhao et al., 2011). Les régions basiques BR1, 2, et 3 sont responsables de la localisation nucléaire, voire nucléolaire, d'HBZ (Hivin et al., 2005; Murata et al., 2006). Une étude récente propose qu'HBZ aurait un NES fonctionnel dans sa partie N-terminale et pourrait être exporté vers le cytoplasme en présence du facteur cellulaire GADD34 (growth arrest and DNA damage gene 34) (Mukai and Ohshima, 2014). HBZ ne forme pas d'homodimère stable et doit donc s'associer avec un autre facteur de transcription pour pouvoir lier l'ADN. Or, en C-terminal, HBZ possède un domaine bZIP, formé par les régions BR3 et ZIP, grâce auquel il s'hétérodimérise avec de nombreux facteurs AP-1 des familles Jun, ATF/CREB, et Maf, et module leur activité transcriptionnelle (Ma et al., 2016). Via son domaine bZIP, HBZ interagit aussi avec le domaine HAT (histone acétyltransférase) de p300/CBP et inhibe son activité d'acétylation d'histones et de facteurs de transcription, au niveau des résidus lysines (Wurm et al., 2012). Enfin, l'ajout de modifications post-traductionnelles a été rapporté pour HBZ, mais ne semble affecter ni sa stabilité ni sa fonction (Dissinger et al., 2014).

2. HBZ permet l'acquisition de caractéristiques tumorales par la cellule infectée

a. Persistance de l'infection par HTLV-1

Arnold et al. ont montré que l'expression d'*hbz* n'est pas essentielle à la production de nouvelles particules virales ni à l'immortalisation de PBMC humains *in vitro* (Arnold et al., 2006, 2008). Par contre, lorsqu'ils ont inoculé à des lapins des cellules irradiées, productrices de virus mutés au niveau de la séquence codante d'HBZ, ils ont détecté une chute de la charge provirale qui corrélait avec une faible réponse anticorps, en comparaison avec le virus sauvage. Ceci démontre la rapide nécessité de l'intervention d'HBZ pour la persistance de l'infection *in vivo* (Arnold et al., 2006).

L'une des premières fonctions décrites pour HBZ est la répression de la transcription virale à partir du LTR5', et donc de la production de nouveaux virions. En effet, HBZ entre en compétition avec Tax pour la liaison aux facteurs cellulaires CREB et CREB-2 et empêche de ce fait le positionnement de Tax au niveau des boîtes TxRE du promoteur viral (Gaudray et al., 2002; Lemasson et al., 2007). De plus, grâce aux deux motifs LXXLL de son domaine d'activation, HBZ interagit directement avec le domaine KIX de p300/CBP et prévient leur recrutement par Tax (Clerc et al., 2008). Outre la suppression de la transcription Tax-dépendante, l'association d'HBZ avec CREB et p300/CBP a des conséquences sur l'expression du génome cellulaire. Par exemple, la formation des dimères HBZ/CREB interfère avec l'activation du promoteur de la cycline D1 par CREB (Ma et al., 2013b). De même, l'interaction entre HBZ et la surface MLL (mixed-lineage leukemia) du domaine KIX de p300/CBP réprime l'activation de la transcription MLL-dépendante mais stimule celle induite par c-Myb (Cook et al., 2011). Selon une étude récente, l'interaction entre HBZ et des protéines de la famille NFAR (nuclear factors associated with double-stranded RNA) influencerait aussi sur l'expression des gènes viraux et cellulaires (Murphy et al., 2016). Par ailleurs, HBZ inhibe l'export par Rex des messagers viraux non épissés, tels que *gag/pol*. Ceci participerait au maintien du provirus sous un état latent (Li et al., 2012; Philip et al., 2014). HBZ peut aussi inverser le processus de sénescence qui résulte de la suractivation de la voie NF- κ B par Tax (Zhi et al., 2011). HBZ n'affecte pas la voie non-canonique de NF- κ B. Par contre, il supprime la voie canonique en agissant à différents niveaux : (i) il altère la capacité de liaison à l'ADN de p65, (ii) induit sa dégradation par le protéasome en stimulant l'expression de l'ubiquitine ligase E3 PDLIM2, responsable de la polyubiquitination de p65 mais aussi de celle de Tax, et (iii) réprime l'acétylation de p65 par p300/CBP (Wurm et al., 2012; Yan et al., 2009; Zhao et al., 2009). Ainsi, HBZ autorise la cellule infectée à reprendre son cycle prolifératif (Zhi et al., 2011). En inactivant la voie canonique de NF- κ B, HBZ perturbe également l'expression de certains gènes impliqués dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Zhao et al., 2009).

En effet, HBZ joue un rôle dans l'altération de la réponse immune cellulaire. Il a été montré que des souris transgéniques HBZ-Tg, exprimant *hbz* dans leurs lymphocytes T CD4⁺, sont plus sensibles à l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes* ou par le virus de l'herpès simplex de type 2. Ceci s'explique en partie par le fait que leurs cellules T CD4⁺ ne produisent pas d'interféron gamma (IFN- γ), une cytokine nécessaire à la mise en place de la réponse immune contre ces pathogènes, car HBZ empêche la liaison de NFAT et c-Jun au niveau du promoteur de l'IFN- γ , et donc son activation (Sugata et al., 2012). Toujours à partir de lymphocytes T CD4⁺ de souris HBZ-Tg, il a récemment été découvert qu'HBZ atténuerait la réponse immunitaire dirigée contre HTLV-1, en stimulant l'expression de la molécule co-inhibitrice TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain) ainsi que la production d'IL-10, une cytokine immunosuppressive (Yasuma et al., 2016). D'autre part, la mise en place d'une réponse T cytotoxique contre HBZ est déterminante quant à la progression de la maladie.

Cependant, elle serait le plus souvent inefficace à cause du faible niveau d'expression d'HBZ, dont le messager est fortement séquestré dans le noyau, et de la mauvaise présentation de ses épitopes aux lymphocytes T CD8⁺ (Hilburn et al., 2011; MacNamara et al., 2010; Rende et al., 2011; Rowan et al., 2014). L'ensemble de ces observations corrèle avec le fait que la plupart des patients infectés par HTLV-1 sont immunodéprimés, et que cet état conditionnerait l'émergence et la sévérité de l'ATL (Gabet et al., 2000; Iwanaga et al., 2012). Finalement, la latence virale, l'évasion de la réponse immunitaire, et la réversibilité de l'état de sénescence, sont autant de caractéristiques qui contribuent à la persistance de l'infection virale.

b. Modulation phénotypique des lymphocytes T infectés et inflammation

L'ATL se caractérise par une augmentation du nombre de lymphocytes T infectés et une forte capacité de ces cellules à migrer et à créer des lésions internes et/ou externes (Matsuoka and Yasunaga, 2013). Néanmoins, l'inhibition de l'expression d'*hbz* par ARN interférence, dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, conduit à une diminution de leur prolifération *in vitro*, et réduit leur capacité à former des tumeurs solides et à infiltrer des organes dans des souris NOG (Arnold et al., 2008). A l'inverse, il a été montré que les souris HBZ-Tg présentent un état inflammatoire chronique, avec infiltration de cellules T CD4⁺ infectées au niveau des poumons et de la peau, et peuvent développer, après une période de latence, un lymphome à cellules T similaire à celui observé chez certains patients ATL (Satou et al., 2011; Zhao et al., 2014). HBZ joue donc un rôle clef dans le développement de l'ATL, et l'inflammation chronique observée en présence d'HBZ pourrait faciliter l'acquisition du phénotype cancéreux.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont impliqués dans la modulation des réponses immune et inflammatoire, et sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3. Il existe plusieurs types de Treg, selon le lieu de leur développement. La différenciation des lymphocytes T naïfs au niveau du thymus génère des Treg dits « naturels », alors qu'elle donne lieu, en périphérie, à des Treg « inductibles » (iTreg). Les iTreg peuvent perdre l'expression de FoxP3 et se convertir en cellules productrices d'IFN- γ , un puissant médiateur de l'inflammation (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Or, l'expression de FoxP3 dans les cellules infectées par HTLV-1 est détectée dans 2 cas d'ATL sur 3, suggérant l'intervention des Treg dans l'émergence de cette maladie (Karube et al., 2004). En effet, il a été montré que les souris HBZ-Tg présentent une forte augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ FoxP3⁺ et qu'HBZ promeut la différenciation des cellules T infectées en Treg, en stimulant la transcription du gène *foxp3* par la voie Smad3/TGF- β (Satou et al., 2011; Zhao et al., 2011). Cependant, ces Treg sont fonctionnellement inactifs du fait de l'interaction d'HBZ avec FoxP3 et NFAT (Satou et al., 2011). D'autre part, les Treg induits par HBZ sont principalement des iTreg et ont tendance à devenir FoxP3⁻ et à produire de l'IFN- γ , ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires (Yamamoto-Taguchi et al., 2013). Enfin, selon une étude récente, les cellules productrices d'IFN- γ stimulent l'inflammation induite par HBZ, et le développement de lymphome dépend directement du degré de cette inflammation chez les souris HBZ-Tg. Ainsi, en modulant le phénotype des lymphocytes T infectés et en dérégulant la fonction des Treg, HBZ favorise l'établissement d'un état inflammatoire chronique qui contribue à l'accélération du processus carcinogène (Mitagami et al., 2015).

c. Instabilité génétique

Les cellules ATL présentent de nombreuses anomalies génétiques, avec de fréquentes mutations, fusions de gènes, et délétions intragéniques (Kataoka et al., 2015). Bien qu'HBZ soit le seul facteur viral dont l'expression est constitutive, son rôle dans la génération d'instabilité

généétique est peu documenté. Toutefois, l'induction de cassures double brin de l'ADN par HBZ a été rapportée en transfection dans des cellules HeLa et découlerait de la capacité d'HBZ à déréguler l'expression de certains miARN au niveau post-transcriptionnel (Vernin et al., 2014). Les miARN contrôlent l'expression génique en déstabilisant les ARN messagers ou en inhibant directement leur traduction. Ils interviennent donc dans la plupart des processus biologiques, dont la prolifération cellulaire et la conservation de l'intégrité génomique (Moles and Nicot, 2015). Vernin et al. ont montré qu'HBZ supprime l'expression de hSSB2 (human single-strand DNA-binding protein 2), un facteur de réparation des cassures double brin de l'ADN, en partie *via* la surexpression de miR17 et miR21 (Vernin et al., 2014). Par ailleurs, HBZ semble atténuer la réponse DDR. En effet, HBZ interagit avec GADD34 et empêche l'inactivation de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) par GADD34 (Mukai and Ohshima, 2014). De plus, HBZ induit un délai dans l'arrêt en phase G2/M des cellules exposées à l'étoposide, un agent génotoxique. Ce retard a été attribué à une diminution de l'acétylation de p53, et donc de son activité transcriptionnelle, du fait de l'inhibition de l'activité HAT de p300/CBP par HBZ (Wright et al., 2015; Wurm et al., 2012). Etant donné le rôle de p53 dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN, il est possible que certaines cellules infectées exprimant HBZ entrent en phase de mitose malgré la présence de lésions dans leur ADN. Ceci a effectivement pu être observé *in vitro* lors de la surexpression de miR17 et miR21 induite par HBZ (Vernin et al., 2014). Une étude récente apporte une explication quant à la mécanistique de dérégulation de l'expression des miARN par HBZ (Gazon et al., 2016). Elle suggère que l'expression de la majorité des miARN dans les cellules ATL est plutôt régulée négativement, comme le montraient les travaux publiés en 2012 par Yamagishi et al. (Yamagishi et al., 2012; Gazon et al., 2016). En fait, la protéine HBZ empêche la maturation des miARN en réprimant la transcription du gène *Dicer*, initiée par le facteur de transcription JunD. L'expression de *Dicer* ainsi que la maturation des miARN peuvent être restaurées *in vitro*, dans des cellules T CD4⁺ isolées de patients ATL, par traitement au valproate (VPA) (Gazon et al., 2016). Cet inhibiteur d'histone déacetylase (HDAC) est connu pour éteindre l'expression d'*hbz* et est utilisé pour le traitement de l'ATL (Belrose et al., 2011). De plus, le traitement au VPA rend des cellules chroniquement infectées par HTLV-1 sensibles à l'étoposide, apportant une nouvelle piste pour l'amélioration du traitement de l'ATL (Gazon et al., 2016).

d. Résistance à l'apoptose et prolifération des cellules infectées

hbz permet à la cellule infectée de sortir de l'état de sénescence, d'échapper au système immunitaire, et génère de l'instabilité génétique (Ma et al., 2016). De plus, *hbz* est capable d'induire la prolifération et la transformation de lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Arnold et al., 2008; Satou et al., 2006, 2011). Ce facteur viral joue donc un rôle central dans le développement et le maintien de l'ATL. Cependant, les modalités d'action d'*hbz* sont loin d'être totalement comprises. En l'occurrence, on ne sait toujours pas avec certitude sous quelle forme le gène *hbz* induirait la survie et la prolifération de la cellule infectée.

En 2006, il a effectivement été proposé que le transcrite d'*hbz* serait fonctionnel en tant qu'ARN non codant, car il soutient *in vitro* la survie et la prolifération de la lignée Kit 225, dérivée de cellules T leucémiques humaines et dépendante d'IL-2 pour sa croissance. Cet effet pro-prolifératif a été observé en présence d'une faible concentration d'IL-2 et impliquerait la formation d'une structure secondaire en tige-boucle, et la surexpression subséquente du facteur de transcription E2F1 et de ses gènes cibles (Satou et al., 2006). Toujours au sein du laboratoire du Dr Matsuoka, une étude a récemment été menée afin de discriminer entre les activités de la protéine et du transcrite d'*hbz* (Mitobe et al., 2015). Des lymphocytes T CD4⁺ primaires de souris ont donc été transduits avec des vecteurs rétroviraux exprimant ces différentes formes d'*hbz*. Mitobe et al. ont pu observer, qu'en présence d'IL-2, le message d'*hbz* promeut l'entrée en

phase S des cellules murines T CD4⁺. Il réduit également leur apoptose via un motif formé grâce aux 50 premières paires de bases de la séquence codante d'*hbz*. De plus, il module l'expression de gènes, tels que *RBI*, *E2F1*, et *survivine*, qui régulent le cycle cellulaire, la prolifération, et la survie. A l'instar de l'ARN, la protéine HBZ promeut l'entrée en phase S et donc la prolifération cellulaire. Paradoxalement, elle induit aussi l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ primaires de souris et serait plutôt impliquée dans la régulation de l'expression de *FoxP3*, ainsi que de gènes codant pour des cytokines. La protéine et le transcrit d'*hbz* auraient donc des effets distincts, voire opposés, sur la biologie de la cellule infectée, et l'ARN permettrait de contrebalancer les effets pro-apoptotiques de la protéine. Cependant, les résultats publiés cette année par le laboratoire du Dr Matsuoka indiquent que les souris transgéniques SM (pour « silent mutation »), exprimant une protéine HBZ intacte dans leurs lymphocytes T CD4⁺ mais un messenger non fonctionnel en tant qu'ARN non codant, présentent de manière surprenante un phénotype équivalent à celui des souris sauvages HBZ-Tg, qui expriment à la fois la protéine et le transcrit d'*hbz* (Kawatsuki et al., 2016). Bien que l'expression du gène *hbz* y soit 5 fois plus faible, les lymphocytes T CD4⁺ des souris SM-Tg sont aussi caractérisés par l'activation de la voie Rb/E2F-1, et la surexpression subséquente de certains gènes cibles de E2F-1, favorisant l'entrée en phase S ou ayant une fonction pro-apoptotique. En effet, HBZ interagit avec Rb et permet d'activer la transcription dépendante de E2F-1. Comme les souris sauvages, les souris SM-Tg se distinguent des non transgéniques par une forte prolifération lymphocytaire et une augmentation marquée du nombre de cellules T CD4⁺ FoxP3⁺. Cette étude suggère donc que les effets de la protéine HBZ prévaudraient sur ceux de l'ARN *in vivo*.

Contrairement à ce qui a été récemment avancé, Tanaka-Nakanishi et al. avaient proposé un rôle anti-apoptotique pour la protéine HBZ (Tanaka-Nakanishi et al., 2014). Dans les lignées T lymphoblastiques humaines, Jurkat et CEM, l'expression stable d'*hbz* rendait les cellules résistantes à l'apoptose induite par la stimulation PMA/ionomycine. En fait, ils ont montré qu'HBZ réprime la transcription des gènes pro-apoptotiques *Bim* et *FasL* en interagissant avec FoxO3a, responsable du contrôle de leur expression. De par son association directe avec FoxO3a, HBZ diminue l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription et le séquestre dans le noyau sous forme inactive. D'autres résultats vont aussi dans le sens d'une fonction anti-apoptotique de la protéine HBZ. En effet, elle active de manière dose-dépendante le promoteur de la *survivine*, et stimule l'expression du gène anti-apoptotique *bfl-1* induite par JunD (Macaire et al., 2012; Murphy et al., 2016). Néanmoins, ces études ont été menées sans discriminer entre les activités de la protéine et du transcrit d'*hbz*. Aussi, le rôle de la protéine HBZ dans la survie des cellules infectées reste à éclaircir. Par ailleurs, il a été montré que la protéine HBZ interagit avec ATF3, un facteur de type bZIP dont l'expression est constitutive dans les cellules ATL. Or, ATF3 agit aussi bien en tant que suppresseur ou promoteur de tumeur. Dans le cadre de l'ATL, Hagiya et al. ont montré que le facteur de transcription ATF3 promeut la survie et la prolifération cellulaire. A l'instar d'HBZ, ATF3 inhibe la transcription virale et cellulaire dépendante de Tax, à partir des sites TxRE et CRE. De plus, ATF3 stimule l'expression de régulateurs positifs de la transition G1/S, tels que *CDC2* et *cycline E2*, et réprime celle du facteur pro-apoptotique *Bim*. Par contre, ATF3 stabilise p53, augmentant indirectement son activité transcriptionnelle, mais HBZ contrecarre cet effet (Hagiya et al., 2011). Ensuite, HBZ interagit avec un autre facteur bZIP, C/EBP α , connu pour réguler négativement la prolifération cellulaire. Pourtant, C/EBP α est surexprimé chez les patients atteints d'ATL et HBZ induit son expression dans les lymphocytes T CD4⁺ de souris HBZ-Tg. Aussi, HBZ contrebalancerait les effets anti-prolifératifs de C/EBP α en altérant son activité transcriptionnelle, *via* le recrutement de Smad3, et en dérégulant l'expression de ses gènes cibles (Zhao et al., 2013). Outre les voies de signalisation ATF/CREB, C/EBP, et TGF- β /Smad, HBZ perturbe les voies Wnt, canonique et non-canonique. HBZ s'oppose à l'activation de la

voie canonique Wnt/ β -caténine par Tax, en diminuant l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription LEF1. Au contraire, HBZ induit la voie antagoniste de Wnt/ β -caténine, en activant le promoteur du facteur non-canonique Wnt5a *via* la voie TGF- β . L'expression de Wnt5a promeut la prolifération et la migration des cellules infectées (Ma et al., 2013a).

Finalement, *hbz* pourrait avoir recours à de nombreuses stratégies pour induire la survie et donc permettre la prolifération de la cellule infectée. Cependant, les mécanismes de son action restent encore obscurs. C'est pourquoi, pendant ma thèse, je me suis concentrée sur l'étude de certains aspects de cette mécanistique, faisant intervenir les facteurs cellulaires BDNF, TrkB, JunD, et RPS25, dont les rôles ont été peu, voire pas du tout, abordés de manière délibérée, car ils le seront dans la partie « Résultats ».

RESULTATS ET DISCUSSION

Article I : HBZ promeut la survie des cellules T infectées par HTLV-1 en stimulant la voie autocrine/paracrine BDNF/TrkB

HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. **Nicholas Polakowski, Marie Terol**, Kimson Hoang, Isabelle Nash, Sylvain Laverdure, Hélène Gazon, Gilda Belrose, Jean-Michel Mesnard, Raymond Césaire, Jean-Marie P elophon ese, Isabelle Lemasson. *J. Virol.* 2014 Nov, 88(22):13482-94. DOI: 10.1128/JVI.02285-14. Epub 2014 Sep 10. **N.P. and M.T. contributed equally to this article.**

I. Introduction : l'axe BDNF/TrkB

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) appartient à la famille des neurotrophines et joue donc, par définition, un rôle dans le développement, le maintien, et la plasticité du système nerveux central et périphérique. Cette glycoprotéine est aussi sécrétée par les cellules immunitaires et intervient, par exemple, dans le développement des cellules T dans le thymus (Kerschensteiner et al., 2003; Maroder et al., 1996).

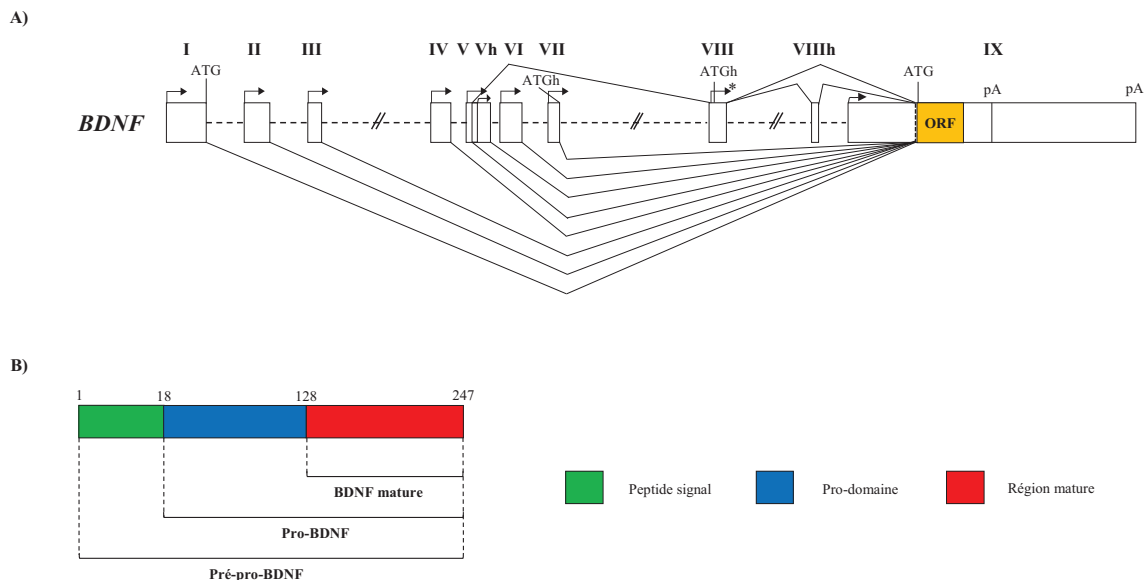


Figure 10 : Représentation schématique du gène et de la protéine BDNF. (A) Structure du gène *BDNF* chez l'homme et le rongeur (adapt e de West et al., 2014). Les boîtes, lignes horizontales en pointill es, ainsi que les flèches, figurent respectivement les exons, les introns, et les principaux sites d'initiation de la transcription. Les lignes reliant les exons indiquent un  v enement d'épissage alternatif. La ligne verticale en pointill es, au sein de l'exon IX, représente le site accepteur d'épissage. L'astérisque indique que l'utilisation de ce TSS est propre aux rongeurs. ORF, open reading frame ; ATG, codon initiateur de la traduction ; h, spécifique à l'homme ; pA, site de polyadénylation. (B) L'ORF de *BDNF* donne lieu à la production d'une pré-pro-neurotrophine (d'après Greenberg et al., 2009).

Le gène *BDNF* comprend 9 exons, le dernier exon renfermant la s equen e codante ainsi que la région 3'UTR (Figure 10A). En amont de l'ORF, la présence de plusieurs exons et sites d'initiation de la transcription (TSS), permet de moduler la région 5'UTR des transcrits et de générer plus de 18 ARNm différents. Outre l'utilisation de mécanismes d'épissage alternatif et de multiples promoteurs, l'existence de 2 sites de polyadénylation dans l'exon IX, en aval de l'ORF, autorise la production de deux populations de transcrits, caractérisées par la longueur de leur 3'UTR. L'ensemble de ces mécanismes assure une régulation spatio-temporelle de l'expression de *BDNF*, en fonction du type tissulaire et de la nature du stimulus. Par exemple,

dans le système nerveux central, l'activité neuronale constitue l'un plus efficaces inducteurs de l'expression de *BDNF* et active préférentiellement le promoteur de l'exon IV. La régulation de la transcription à partir du promoteur IV est complexe et reflète celle des autres promoteurs. Elle fait intervenir une multitude de facteurs et cofacteurs de la transcription, ainsi que des séquences régulatrices distales et des modifications des histones et de l'ADN. L'expression de *BDNF* est également contrôlée au niveau traductionnel. En effet, la région 3'UTR est déterminante quant à la localisation subcellulaire des transcrits *BDNF*. De plus, elle est la cible potentielle de plusieurs miARN, qui pourraient altérer leur stabilité et/ou leur traduction. Enfin, il existe des transcrits *BDNF* antisens, apparemment non codants, qui s'associeraient aux transcrits sens et réguleraient leur traduction (Greenberg et al., 2009; West et al., 2014).

En dépit de la diversité des messagers de *BDNF*, leur traduction au niveau du RE génère un unique précurseur protéique de 247 acides aminés, nommé pré-pro-BDNF (Figure 10B). Ce dernier encours d'abord un clivage protéolytique en N-terminal, qui autorise son transport du RE vers le Golgi. La pro-neurotrophine, pro-BDNF, ainsi obtenue est ensuite clivée dans la cellule par des endoprotéases, au sein du *trans*-Golgi, ou par des proconvertases, dans des granules de sécrétion immatures. La maturation de pro-BDNF en BDNF peut aussi s'effectuer à l'extérieur de la cellule, grâce à la plasmine ou à des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Greenberg et al., 2009). Les deux formes pro-BDNF et BDNF sont sécrétées et biologiquement actives. Pro-BDNF interagit préférentiellement avec $p75^{\text{NTR}}$, un récepteur de la famille TNFR, qui agit comme promoteur ou suppresseur de tumeur selon le type cellulaire. A l'inverse, la forme mature BDNF a une plus grande affinité pour le récepteur TrkB (tyrosine kinase receptor B) et est associée à la survie et la différenciation cellulaire (Hempstead, 2015).

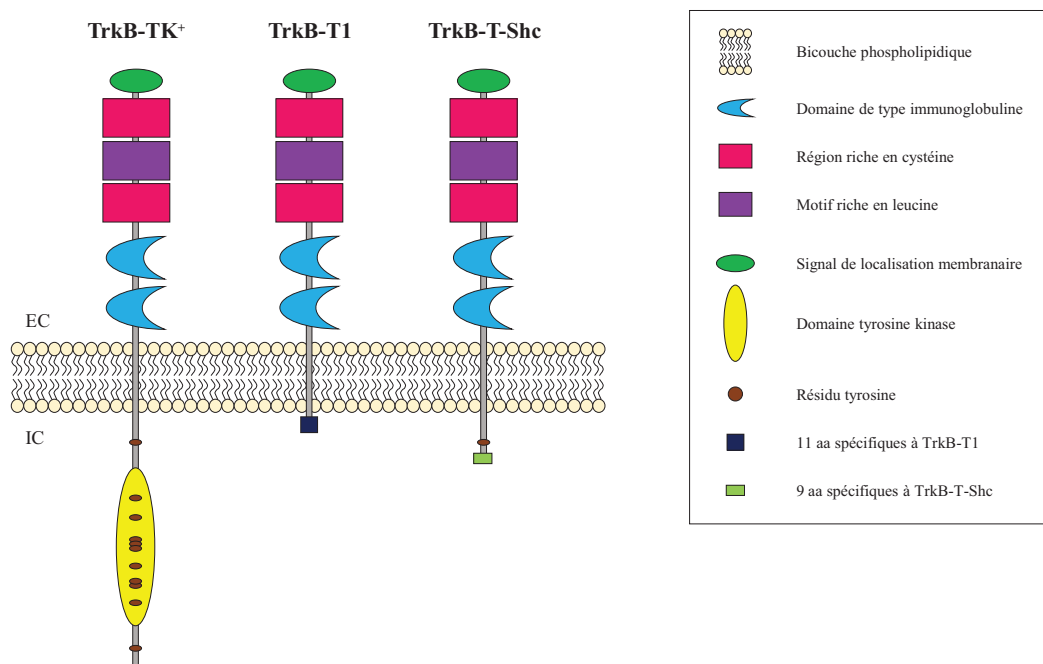


Figure 11 : Les trois principales isoformes du récepteur TrkB et leurs domaines fonctionnels (adapté de Minichiello, 2009 ; Thiele et al., 2009). EC, extracellulaire ; IC, intracellulaire.

Il existe trois isoformes majeures de TrkB : une forme complète, TrkB-TK⁺, et deux formes plus courtes, TrkB-T1 et TrkB-T-Shc, dépourvues de domaine tyrosine kinase (TK) (Figure 11) (Minichiello, 2009; Thiele et al., 2009). Les récepteurs TrkB-T1 et TrkB-T-Shc sont générés par épissage alternatif et diffèrent de TrkB-TK⁺ uniquement au niveau de leur domaine C-terminal cytoplasmique. La partie extracellulaire, commune aux trois isoformes, est fortement glycosylée et comprend plusieurs domaines : un peptide signal, pour l'adressage de

TrkB à la membrane plasmique ; deux régions riches en cystéine et un motif riche en leucine, permettant la liaison de BDNF à forte affinité ; ainsi que deux domaines de type immunoglobuline, responsables de la spécificité de cette liaison. TrkB-TK⁺ et TrkB-T1 sont exprimés dans le cerveau et dans les cellules non-neurales, alors que l'isoforme TrkB-T-Shc est exclusivement cérébrale (Gupta et al., 2013).

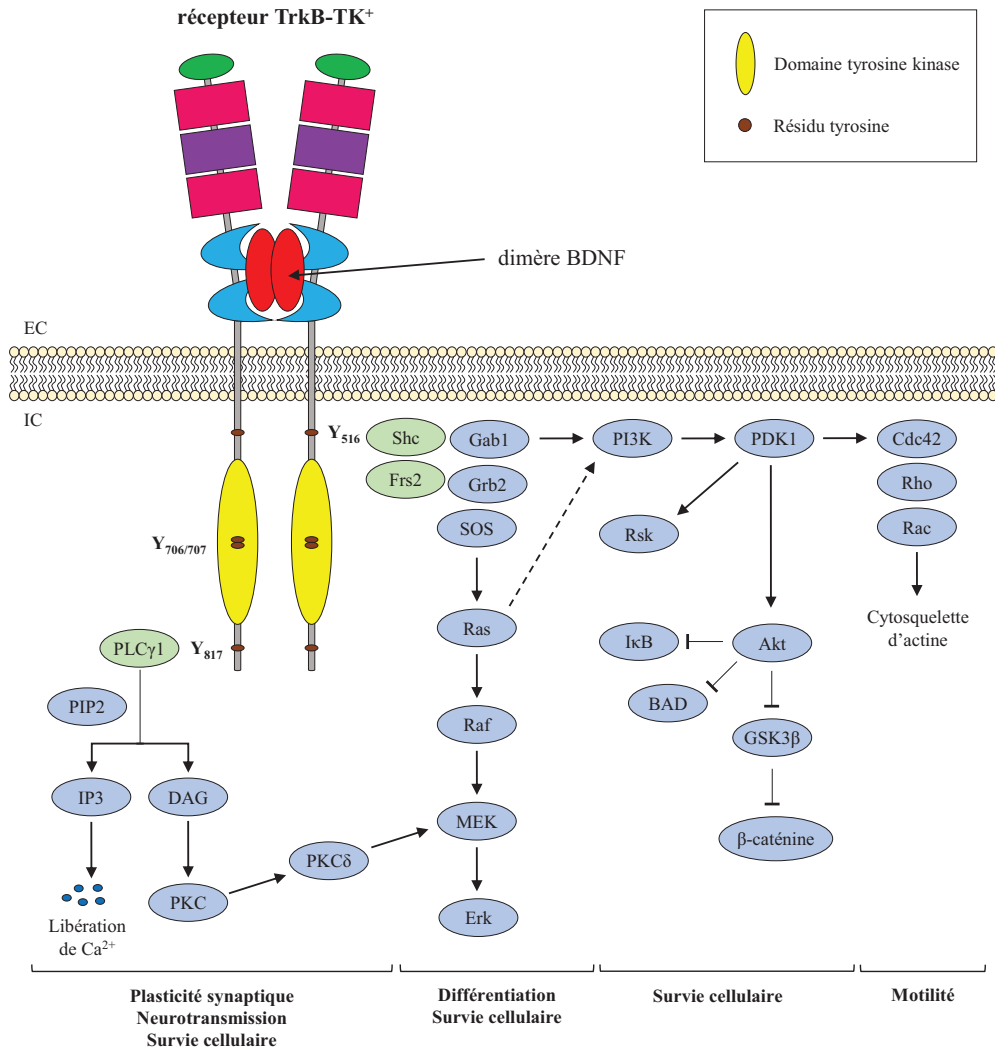


Figure 12 : Schéma illustrant les principales voies de signalisation cellulaire activées par TrkB-TK⁺ (adapté de Minichiello, 2009 ; Thiele et al., 2009). BAD, Bcl-2-associated agonist of cell death ; DAG, diacylglycerol ; EC, extracellular ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; Frs2, fibroblast growth factor receptor substrate 2 ; Gab1, Grb-associated binder 1 ; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2 ; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β ; IC, intracellular ; IP3, inositol-1,4,5-trisphosphate ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; MEK, MAPK/ERK kinase ; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 ; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PKC, protein kinase C ; PLCγ1, phospholipase Cγ1 ; RSK, ribosomal protein S6 kinase ; Shc, Src homology 2 domain containing protein ; SOS, son of sevenless.

Lorsque BDNF se lie, sous forme de dimère, au récepteur TrkB-TK⁺, ce dernier s'homodimérise et l'autophosphorylation de plusieurs de ses résidus tyrosine (Y) a lieu, dans la partie cytoplasmique du récepteur (Figure 12) (Minichiello, 2009; Thiele et al., 2009). La phosphorylation des résidus Y706/707, localisés au sein du domaine catalytique TK, est caractéristique de l'activation du récepteur TrkB-TK⁺. La phosphotyrosine 515 est reconnue par les molécules adaptatrices Shc ou Frs2, alors que la phosphotyrosine Y817 permet l'ancrage de PLCγ1. Ainsi, l'activation de l'axe BDNF/TrkB induit la survie cellulaire *via* trois principales voies de signalisation : Ras/MAPK, PI3K/PDK1/Akt, et PLCγ. La phosphorylation

de PLC γ 1 par TrkB-TK⁺ provoque la libération intracellulaire de Ca²⁺ et l'activation subséquente de kinases dépendantes de la Calmoduline (CamK). S'en suit la phosphorylation du facteur de transcription CREB et la transcription de ses gènes cibles, parmi lesquels se trouve le gène *BDNF*. Le facteur cellulaire Ras joue aussi un rôle clef dans la survie des cellules, *via* l'induction des voies PI3K/PDK1/Akt et Raf/MEK/Erk. Par exemple, Erk/MAPK intervient dans l'activation de CREB. Au contraire, Akt inactive la kinase GSK3- β (glycogen synthase kinase 3 β) en phosphorylant sa sérine 9, empêchant ainsi la dégradation de la β -caténine (Cole, 2012). Ce facteur essentiel de la voie Wnt peut alors s'accumuler dans le noyau et induire l'expression de nombreux gènes, en s'associant avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. L'inactivation de GSK3- β et la stabilisation de la β -caténine sont associés à la survie des cellules T (Ding et al., 2008; Sengupta et al., 2007).

L'activation des récepteurs TrkB-T1 et TrkB-T-Shc par BDNF n'a pas les mêmes effets sur la biologie de la cellule. Ces isoformes, tronquées dans leur partie C-terminale, n'ont pas d'activité tyrosine kinase ni de domaine d'ancrage pour PLC γ 1. Seul le récepteur TrkB-T-Shc conserve un domaine de liaison à Shc (Figure 11). Bien que leur fonction soit encore mal comprise, TrkB-T1 et TrkB-T-Shc pourraient agir en tant que régulateurs négatifs de l'activité de TrkB-TK⁺. En effet, ils sont capables de s'hétérodimériser avec TrkB-TK⁺ et d'empêcher son autophosphorylation, et donc la mise en place d'une réponse cellulaire. TrkB-T1 peut également lier BDNF et induire son internalisation, régulant ainsi la concentration extracellulaire en BDNF. Enfin, TrkB-T1 pourrait activer certaines voies de signalisation cellulaire, influençant la morphologie et la prolifération cellulaire (Akil et al., 2016; Fenner, 2012).

Depuis sa découverte, l'axe BDNF/TrkB a été impliqué dans le développement et la progression de cancers du système nerveux mais aussi des tissus non-neuraux. Par exemple, la forte expression de TrkB-TK⁺ chez les enfants ayant développé un néphroblastome, ou tumeur de Wilms, s'accompagne d'une réduction significative de leurs chances de survie. A l'inverse, leur pronostic vital s'améliore lorsque c'est l'expression des isoformes TrkB-T1 et TrkB-T-Shc qui prédomine au sein de la tumeur. De même, la co-expression de BDNF et de son récepteur, TrkB, promeut la survie et la chimiorésistance des cellules tumorales de neuroblastome et engage donc le pronostic vital des patients. Cette effet dépendrait en partie de l'activation de TrkB-TK⁺ et de l'inactivation de GSK3- β *via* la voie PI3K/Akt (Thiele et al., 2009).

Lors de l'analyse, par la technique de puce à ADN, du profil d'expression génique de cellules HeLa et Jurkat, exprimant de manière stable la protéine HBZ du HTLV-1, nous avons détecté une forte expression de BDNF par rapport aux cellules exprimant le vecteur contrôle. Nous nous sommes donc penchés sur l'étude de l'axe BDNF/TrkB dans des lignées T chroniquement infectées par HTLV-1, ainsi que dans des PBMCs de patients ATL, déplétés en cellules CD8⁺. Nous avons pu montrer que la protéine HBZ, et non son transcrit, stimule l'expression de BDNF au niveau transcriptionnel, et que les cellules de patients atteints d'ATL surexpriment à la fois BDNF et son récepteur TrkB. De plus, ces patients présentent une concentration sérique anormalement élevée de la forme mature de BDNF, suggérant l'existence d'une boucle autocrine/paracrine BDNF/TrkB. L'activité de cette boucle a en effet été confirmée *in vitro*, dans des lignées chroniquement infectées par HTLV-1, et promeut la survie de ces cellules, probablement *via* l'inactivation de GSK3- β .

II. Article

HBZ Stimulates Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Autocrine/Paracrine Signaling To Promote Survival of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected T Cells

Nicholas Polakowski,^a Marie Terol,^{a,b} Kimson Hoang,^a Isabelle Nash,^a Sylvain Laverdure,^a Hélène Gazon,^{b,c} Gilda Belrose,^c Jean-Michel Mesnard,^b Raymond C esaire,^c Jean-Marie P elophon ese,^b Isabelle Lemasson^a

Brody School of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, East Carolina University, Greenville, North Carolina, USA^a; CPBS, CNRS UMR 5236, Université Montpellier 1, Montpellier, France^b; Laboratoire de Virologie-Immunologie JE2503, Centre Hospitalier et Universitaire de Fort de France, Fort de France, Martinique^c

ABSTRACT

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin that promotes neuronal proliferation, survival, and plasticity. These effects occur through autocrine and paracrine signaling events initiated by interactions between secreted BDNF and its high-affinity receptor, TrkB. A BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling loop has additionally been implicated in augmenting the survival of cells representing several human cancers and is associated with poor patient prognosis. Adult T-cell leukemia (ATL) is a fatal malignancy caused by infection with the complex retrovirus human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). In this study, we found that the HTLV-1-encoded protein HBZ activates expression of BDNF, and consistent with this effect, BDNF expression is elevated in HTLV-1-infected T-cell lines compared to uninfected T cells. Expression of TrkB is also higher in HTLV-1-infected T-cell lines than in uninfected T cells. Furthermore, levels of both BDNF and TrkB mRNAs are elevated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from ATL patients, and ATL patient sera contain higher concentrations of BDNF than sera from noninfected individuals. Finally, chemical inhibition of TrkB signaling increases apoptosis in HTLV-1-infected T cells and reduces phosphorylation of glycogen synthase kinase 3  (GSK-3 ), a downstream target in the signaling pathway. These results suggest that HBZ contributes to an active BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling loop in HTLV-1-infected T cells that enhances the survival of these cells.

IMPORTANCE

Infection with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) can cause a rare form of leukemia designated adult T-cell leukemia (ATL). Because ATL patients are unresponsive to chemotherapy, this malignancy is fatal. As a retrovirus, HTLV-1 integrates its genome into a host cell chromosome in order to utilize host factors for replication and expression of viral proteins. However, in infected cells from ATL patients, the viral genome is frequently modified to block expression of all but a single viral protein. This protein, known as HBZ, is therefore believed to modulate cellular pathways necessary for the leukemic state and the chemotherapeutic resistance of the cell. Here we provide evidence to support this hypothesis. We found that HBZ promotes a BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling pathway that is known to enhance the survival and chemotherapeutic resistance of other types of cancer cells. It is possible that inhibition of this pathway may improve treatments for ATL.

Worldwide, approximately 15 million people are infected with the complex retrovirus human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) (1). Although most HTLV-1 carriers do not experience pathological effects from infection, a small percentage of this population will develop one of a diverse spectrum of HTLV-1-associated diseases. Adult T-cell leukemia (ATL) is one of the more prominent diseases known to be linked etiologically to HTLV-1 infection (2). ATL is a fatal malignancy caused by the uncontrolled proliferation of infected CD4⁺ T cells that develops following a persistent viral infection lasting several decades. Chemotherapy has generally proven ineffective in the treatment of ATL patients (3), exemplifying the enhanced survival capabilities of ATL cells.

The initial events toward the development of ATL are believed to involve the viral protein Tax, which displays a number of oncogenic properties. In general, the pleiotropic functions of Tax promote unregulated cell division while concomitantly increasing the susceptibility of the host cell genome to alterations (4). However, Tax is likely to be dispensable following the transition to ATL, as Tax expression is lost in more than half of all ATL patients (5). Certain mechanisms that eliminate Tax expression involve

disruption of the proviral promoter, located within the 5' long terminal repeat (LTR) (5–7), which also abolishes expression of the other viral genes carried on the sense strand of the provirus. However, alterations of the 5' LTR do not block expression of HBZ, which is encoded by a unique gene on the antisense strand of the provirus and is regulated by a separate promoter, located in the 3' LTR (8–11). Indeed, HBZ expression is consistently detected in ATL samples and is believed to succeed Tax in promoting ATL progression (9, 12).

Cellular expression of HBZ alone has been shown to produce

Received 18 August 2014 Accepted 4 September 2014

Published ahead of print 10 September 2014

Editor: S. R. Ross

Address correspondence to Isabelle Lemasson, lemassoni@ecu.edu.

N.P. and M.T. contributed equally to this article.

Copyright   2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.02285-14

oncogenic effects, some of which recapitulate certain features of ATL cells. HBZ expression in cell culture models has revealed its ability to transform immortalized fibroblasts and to prolong survival of an interleukin-2 (IL-2)-dependent T-cell line following withdrawal of the cytokine (9, 13). In HTLV-1-infected T-cell lines, short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of HBZ expression decreases cell proliferation, and in a mouse model, it reduces organ infiltration and tumor formation by the infected cells (14). Finally, transgenic mice expressing HBZ through the CD4 promoter develop lymphomas, with lymphoma cell infiltration of the lungs, bone marrow, spleen, and liver (15).

Effects of HBZ stem from its ability to deregulate cellular gene expression. HBZ localizes to the nucleus, where it is able to interact with a number of transcription factors and coactivators, thereby influencing the activities of these proteins (16). In the current study, we show that HBZ activates transcription of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF is a secreted protein that classically functions to stimulate neuronal proliferation, survival, and plasticity (reviewed in reference 17). These effects occur via signaling cascades that are activated upon binding of BDNF to its high-affinity receptor, TrkB. In certain tumor and leukemic cells, overexpression of TrkB induces a BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling loop that promotes the survival of these cells (18, 19). We found that both BDNF and TrkB are overexpressed in HTLV-1-transformed T-cell lines and in CD8⁺-depleted cells from ATL patients. Furthermore, we provide evidence of enhanced survival of HTLV-1-transformed cells through BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling. It is therefore possible that this HBZ-mediated effect contributes to the enhanced survival capabilities and chemoresistance of ATL cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. HeLa-HBZ, HeLa-HBZ-MutAD, and HeLa-pcDNA clonal cell lines (20) and 293T/17 cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. HeLa clonal cell lines were additionally supplemented with 0.5 mg/ml G418. HeLa-HBZ-US, HBZ-MutZIP, and HBZ-ΔATG clonal cell lines were generated as described previously (20). Jurkat-HBZ and Jurkat-pcDNA clonal cell lines (21) and HTLV-1-infected and uninfected T-cell lines were cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. Jurkat clonal cell lines were additionally supplemented with 1.5 mg/ml G418.

Transfections and lentiviral infections. For lentiviral infections, 2 × 10⁶ 293T/17 cells were culture in 6-cm dishes for 24 h and then transfected with pMD2.G (0.6 pmol), pMDLg/pRRE (1 pmol), and pRSV-Rev (1 pmol), which are Addgene plasmids 12259, 12251, and 12253, respectively, using calcium phosphate. Cells were also cotransfected with 3 pmol of the pRNAT-U6.2/Lenti-V1 control or -V2 shRNA-HBZ vector (14). The medium from each transfection was replaced with 3 ml IMDM-10% FBS at 24 h. At 48 h, 1.25 × 10⁵ MT-2 cells were suspended in the cleared virus culture medium and supplemented with 1.5 ml IMDM-10% FBS and Polybrene (8 µg/ml). The culture medium was replaced with IMDM-10% FBS 24 h after infection, and cells were cultured in the presence of 1 mg/ml G418 for 1 to 2 weeks. For transfections, 6 × 10⁶ C10/MJ cells were suspended in 0.6 ml RPMI-10 mM dextrose-0.1 mM dithiothreitol (DTT) with 18 µg p7LEF-Fos-Luc (22) and 0.1 µg pRL-SV40-Luc (Promega) and electroporated in 0.4-cm cuvettes with a Gene Pulser Xcell instrument (Bio-Rad), using a single exponential-decay pulse of 200 V and 950 µF. Cells were cultured in normal medium for 24 h and subsequently serum starved (0.5% FBS) for 24 h. Cells were then treated with ANA-12 (20

µM), and luciferase activity was measured 24 h later, as described previously (23).

Cells and sera from patients. Peripheral blood samples and sera were used in accordance with French bioethics laws concerning biologic collections. All experiments using patient samples were approved by the Ministère de la Recherche and the Comité de Protection des Personnes. Cells were isolated as described previously (24). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from EDTA-anticoagulated blood samples on Ficoll-density gradients and washed in phosphate-buffered saline (PBS). CD8⁺ cells were removed using anti-CD8 paramagnetic microbeads (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's instructions. CD8⁺ cell-depleted PBMCs were then placed in culture wells (in round-bottomed 24-well plates) at 10⁶ cells/ml in 1 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, and penicillin-streptomycin. Cells were harvested after 5 days at 37°C in 5% CO₂. Sera were separated from the blood samples as follows: after blood cells were clotted for 20 min at room temperature, samples were centrifuged at 20°C and 1,500 × g for 10 min. Sera were then immediately removed and stored at -80°C prior to analysis.

Analysis of sera from patients. Sera were diluted 1:3 in PBS and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a BDNF Emax ImmunoAssay system DuoSet (Promega) as described by the manufacturer. Sera were acid treated and then neutralized as described by the manufacturer for detection of total BDNF (mature and uncleaved forms). This step was not required for detection of mature BDNF. Sera analyzed for mature BDNF were heated at 56°C for 30 min to inactivate HTLV-1 in patient samples.

RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR. RNA was extracted from cell lines by use of TRIzol reagent (Invitrogen) as described by the manufacturer. RNA from healthy donor CD4 T cells was purchased from AllCells. cDNA was synthesized using an iScript (Bio-Rad) or Revert-Aid (Thermo Scientific) kit as described by the manufacturer, with random hexamers or, where indicated, specific primers (for BDNF, 5'-GAAAGCGGGAACCCCTCTAAG; for UBE2D2, 5'-CGTGGG CTCATAGAAAGCAGTCAA; and for HBZ, 5'-GCAACCACATCGCCT CCA). Real-time PCR amplification of cDNAs from cell lines and cDNA purchased from AllCells was performed as described previously (20). Patient and donor sample processing and real-time PCR were performed as described previously (24). Standard curves were generated from each experimental PCR plate for all primer pairs on the plate by using serial dilutions of an appropriate experimental sample. PCR efficiencies from all plates and primer pairs ranged from 78% to 146%, with correlation coefficients of 0.97 to 1.0. Primers used were as follows: BDNF set 1 (transcript IV), 5'-CTGCAGAACAGAAGGAGTACAT (forward) and 5'-CAGCCTTCATGCAACCAAAG (reverse); BDNF set 2 (all), 5'-G CAATTGTGTGGTCAAGTGGCTCTT (forward) and 5'-CCTGCTGCCA TGCATGAAACACTT (reverse); TrkB (NTRK2), 5'-CCGTCACCTTGA CTTGTCTGAACT (forward) and 5'-ATTGGGTATCTGCAGGTTTG CCAG (reverse); and TrkB-TK⁺, 5'-CAGCACATCAAGCGACATAAC (forward) and 5'-CACGCAGACGCCATAGAA (reverse). UBE2D2 reference primers and HBZ primers have been described previously (20). Separate HBZ primers were used for the experiments in Fig. 4 and have been described previously (24). Relative mRNA levels and HBZ mRNA copy numbers were determined as described previously (20). The number of TrkB-TK⁺ mRNA copies per UBE2D2 mRNA copy was determined by amplification of all samples with both primer sets and of serial dilutions of pSG-TrkB-TK⁺HU on the same plate. The pSG-TrkB-TK⁺HU plasmid contains TrkB-TK⁺ and UBE2D2 amplification targets. Copy number ratios were calculated according to the pSG-TrkB-TK⁺HU standard curve.

Determination of BDNF mRNA half-life. Clonal cells were seeded on 6-cm plates and cultured overnight prior to replacing the normal medium with medium containing 1 µg/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich). Cells were harvested at the indicated posttreatment times and processed for

reverse transcriptase PCR (RT-PCR) analysis as described above. Data analysis was done as described previously (20).

Detection of proteins from cellular extracts and culture media. Whole-cell extracts were prepared using RIPA buffer as described previously (25); RIPA buffer was additionally supplemented with Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Proteins from culture media were prepared by culturing 2×10^6 cells/ml for 24 h in serum-free medium. Cells and cellular debris were removed from the medium by centrifugation, and proteins were precipitated from 1.2 ml of the cleared medium by using trichloroacetic acid at a final concentration of 20%. Samples were ice chilled for 2 h or 24 h prior to centrifugation. Protein precipitates were washed twice with 90% acetone-10 mM HCl and suspended in SDS sample dye. Total membrane extracts were prepared as described previously (26). Proteins from whole-cell extracts, culture media, and total membrane extracts were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting as described previously (20). Primary antibodies used for protein detection were as follows: mouse anti-Myc (05-724; Millipore), mouse anti-actin (MAB1501R; Chemicon International), rabbit anti-BDNF (sc-546; Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Ser9 glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) (9336; Cell Signaling), anti-TrkB, and anti-phospho-Tyr706/707 TrkB (kit 4638; Cell Signaling).

Glutathione S-transferase (GST) pulldown assays. GST-KIX was expressed and purified as described previously (23). Glutathione-agarose beads (20 μ l) were equilibrated in BC100 (0.1 M KCl, 20 mM HEPES [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 20 μ M ZnSO₄, 20% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM benzamidine, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, and 2 mM DTT) and incubated with 50 pmol of GST-KIX at 4°C for 1 h. Beads were then washed twice with BC100 and combined with 860 μ g of whole-cell extract in BC100-5% bovine serum albumin (BSA). Binding reaction mixtures were mixed at 4°C overnight, and beads were subsequently washed four times with BC100 and resuspended in SDS sample dye. Eluted proteins were resolved by SDS-PAGE. The primary antibody used for HBZ detection has been described previously (8).

ChIP assays. HeLa clonal cells expressing HBZ or carrying the empty vector were analyzed. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as described previously (27), but using a Zymo-Spin ChIP kit (Zymo Research). For each antibody, 200 μ g (100 μ l) of formaldehyde-cross-linked chromatin was diluted to 1 ml with ChIP dilution buffer; a 10- μ l aliquot of undiluted chromatin served as the input. Antibodies against acetyl-histone H3 (06-559; Millipore) and RNA polymerase II (4H8 and 2629; Cell Signaling) were used. Purified input and ChIP DNA samples were suspended in 50 μ l of water. Real-time PCR amplification of ChIP samples was performed as described above for quantitative real-time PCR, using 2.5 μ l of sample DNA per 15- μ l reaction mix. PCR efficiencies ranged from 76.7% to 153.2%, and correlation coefficients ranged from 0.963 to 0.999. Primers used were as follows: for BDNF 5', 5'-TTGCTCTCTGTAGTCGCCAAG (forward) and 5'-CCAACAGATGCTGGAAGGTA (reverse); for BDNF-IV -725, 5'-ATTCCTCTGATACCCAGTGTG (forward) and 5'-CCCTCCTCCTGAAATTGTGAT (reverse); for BDNF-IV +16, 5'-ATATGACAGCGCACGTCAAG (forward) and 5'-GCAGGGAGATTTCATGCTAGTT (reverse); for BDNF-IV +189, 5'-CGCCATGCAATTTCCACTATC (forward) and 5'-TCACGTTCCCTTCGCTTAAT (reverse); and for BDNF 3', 5'-TGCAGAAATGGCCTGGAATTA (forward) and 5'-GGATGGTCATCACTCTTCTCAC (reverse). Protein and modification enrichment with each amplicon was quantified relative to the input, as described previously (28), and the maximum enrichment obtained was set to 100%.

Immunofluorescence. C10/MJ cells (5×10^5 to 1×10^6 cells/ml) were seeded on coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for 24 h. Coverslips were treated with poly-L-lysine for 1 h at room temperature and then dried overnight. Cells were then washed with PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM Na₂HPO₄, and 1.5 mM KH₂PO₄) and fixed with PBS-4% paraformaldehyde. Coverslips were then washed with PBS

and incubated at room temperature for 1 h with primary antibodies at a 1:100 dilution in PBS-1% BSA. Coverslips were then washed with PBS-1% BSA and incubated at room temperature for 1 h with secondary antibodies at a 1:400 dilution and with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) in PBS-1% BSA. Coverslips were then washed extensively with PBS and subsequently with water and mounted on slides using ProLong Gold antifade reagent (Life Technologies). Antibodies were as follows: mouse anti-BDNF (359258.11; Millipore), rabbit anti-TrkB (H-181; Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rabbit-Alexa Fluor 488, and goat anti-mouse-Alexa Fluor 635 (Life Technologies). Fluorescence images were acquired by confocal microscopy using an LSM 700 microscope (Zeiss), and images were analyzed using Zen software (Zeiss). Identical settings (except for DAPI staining) were used to acquire images in the absence or presence of primary antibodies. For Fig. 6B, slides were imaged using a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope and NIS-Elements software. Identical settings were used to acquire dimethyl sulfoxide (DMSO) and ANA-12 images.

Cell viability assay. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Cells (5×10^5 cells/ml) were grown in IMDM supplemented with 10% or 0.5% FBS in 24-well plates for 24 h. Cells were treated with the indicated concentrations of ANA-12 (Sigma-Aldrich) or K-252a (Calbiochem) or with an equivalent volume of DMSO for an additional 24 h.

RESULTS

BDNF expression is increased in the presence of HBZ. We developed empty vector control and HBZ-expressing clonal cell lines by using HeLa and Jurkat cells. These cells were subjected to different microarray analyses, and data obtained from Jurkat and HeLa clones indicated that expression of BDNF is elevated in the presence of HBZ. Up to 18 possible transcript variants can be synthesized from the BDNF gene, due to separate transcription start sites and/or alternative splicing (29). Because sequence differences among variants encompass 5' untranslated exons, these variants generally produce identical polypeptides (pro-BDNF) (30). In this study, we mainly analyzed the transcript designated BDNF-IV (accession no. NM_170733.3; herein referred to as BDNF), which we used as a marker of overall BDNF expression, as this variant has been well defined and was readily detectable in assays, while many of the other variants were not (data not shown). To confirm the microarray data, we performed RT-PCR analysis of BDNF in Jurkat clonal cell lines either expressing HBZ or carrying the empty expression vector (pcDNA3.1). BDNF mRNA was detected in each of the HBZ-expressing clones but was absent in cells containing the empty vector (Fig. 1A), suggesting that HBZ induces a significant increase in BDNF expression.

Based on these results, we compared BDNF expression among HTLV-1-infected and -uninfected T-cell lines and primary CD4⁺ T cells from a healthy donor. While BDNF mRNA was detected in four of the five HTLV-1-infected T-cell lines tested, it was absent in all of the uninfected cells (Fig. 1B, top panel). As expected, HBZ mRNA was also detected at various levels in all HTLV-1-infected cell lines (Fig. 1B, bottom panel).

We also examined BDNF and HBZ protein levels among the cell lines. Culture media from the HTLV-1-infected cell lines contained more secreted BDNF than that detected in media from uninfected Jurkat and CEM cells (Fig. 1C). Detection of secreted BDNF from C8166/45 cells suggests that one or more variants other than BDNF-IV are expressed in these cells. Culture media contained both mature and pro-BDNF (quantified in Fig. 1D), which are the cleaved and unprocessed forms of the protein, respectively. Mature BDNF is known to promote cell survival (17), while pro-BDNF has been shown to induce apoptosis in certain

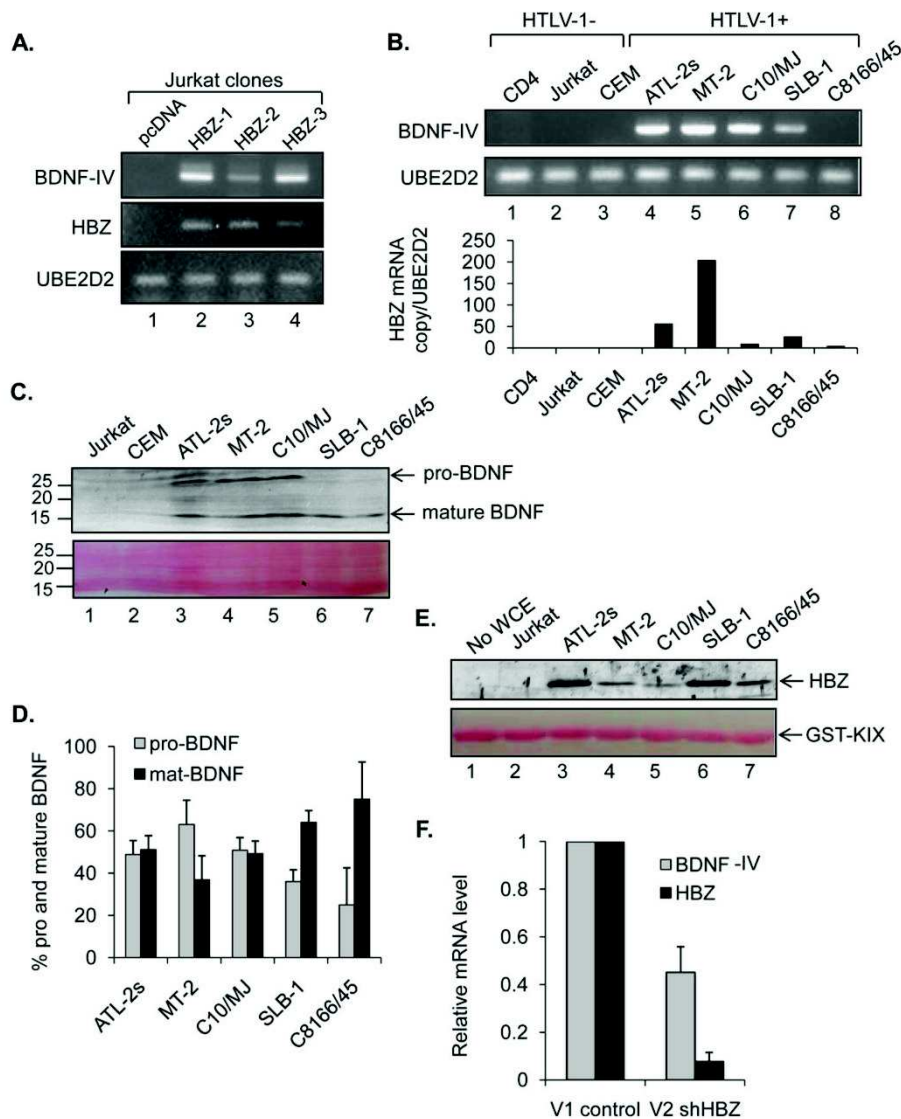


FIG 1 HBZ upregulates BDNF expression. (A) BDNF expression in Jurkat clonal cell lines stably expressing HBZ-S1 or carrying the empty vector. RT-PCR was performed using cDNAs prepared with gene-specific primers for BDNF, UBE2D2, and HBZ. (B) BDNF expression in uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines. The upper panel shows levels of BDNF and UBE2D2 mRNAs analyzed by RT-PCR. RT-PCR was performed using cDNAs prepared with gene-specific primers for BDNF and UBE2D2. The lower panel shows the numbers of copies of HBZ mRNA per copy of UBE2D2 mRNA in the cell lines. cDNAs were prepared using gene-specific primers for HBZ and UBE2D2 for quantitative real-time PCR. The graph shows data obtained with RNAs identical to those used for the upper panel. (C) Western blot detection of BDNF in culture media of uninfected and HTLV-1-infected T-cell lines. The membrane in the upper panel was probed with a BDNF antibody. The lower panel shows the membrane stained with Ponceau S. (D) Western blot quantification of secreted mature and pro-BDNF from three independent experiments. Band densities were quantified using ImageQuant TL (GE Healthcare) and adjusted to the percentage of total mature and pro-BDNF (set to 100%). (E) Western blot detection of HBZ in HTLV-1-infected T-cell lines. The membrane in the upper panel was probed with an HBZ antibody. The lower panel shows the membrane stained with Ponceau S. No WCE, no whole-cell extract. (F) BDNF and HBZ expression in MT-2 cells transduced with negative-control (V1) and HBZ (V2) shRNA lentiviral vectors. The graph shows real-time PCR data from two independent transfection assays, with values normalized to that for V1 (set to 1).

cell types, through p75^{NTR} (31). Levels of HBZ protein were also analyzed in these cells (Fig. 1E). Utilizing the high-affinity interaction between HBZ and the KIX domain of p300/CBP (23), we precipitated HBZ from whole-cell extracts by using GST-KIX bound to glutathione beads. This approach allowed us to efficiently detect HBZ despite limitations in the sensitivity of our HBZ antibody and by avoiding background arising from the antibody light chain, which resolves with HBZ by SDS-PAGE following immunoprecipitation. We detected various amounts of the

HBZ protein in each of the HTLV-1-infected cell lines. Differences in BDNF expression among these cell lines may reflect their heterogeneity, with chromosomal and epigenetic variations possibly influencing BDNF transcription. To corroborate that HBZ upregulates BDNF expression in infected cells, we used shRNA to knockdown HBZ in MT-2 cells and observed a reduction in both HBZ and BDNF mRNAs (Fig. 1F). These results suggest that HBZ is involved in activating BDNF expression in HTLV-1-infected T cells.

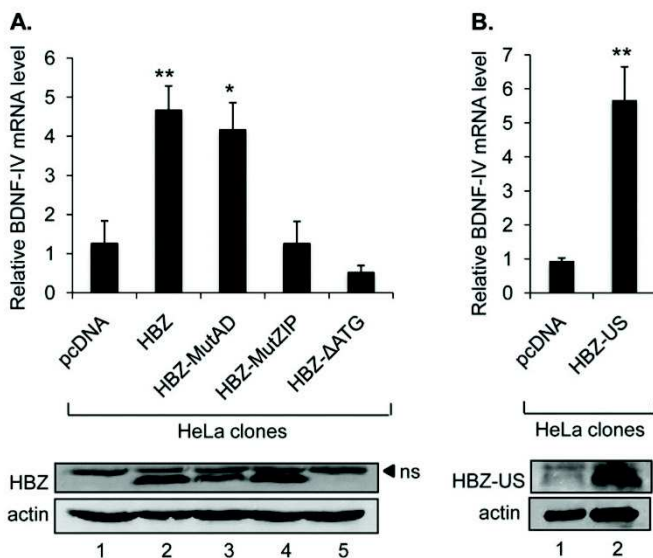


FIG 2 The ZIP domain of HBZ is required for transcriptional activation of BDNF. (A and B) BDNF expression in HeLa clonal cell lines containing the indicated expression vectors (HBZ-S1 wild type and mutants and HBZ-US wild type). The graphs show results from real-time PCR amplification of BDNF normalized to amplification of UBE2D2. Values correspond to three independent experiments and were calculated relative to one data set for cells with pcDNA3.1 alone. Error bars show standard deviations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ (two-tailed Student t test). Lower panels show Western blots of whole-cell extracts prepared from cell lines corresponding to those listed above. Membranes were probed with a Myc antibody for detection of epitope-tagged HBZ and then stripped and probed for actin. ns, nonspecific band.

HBZ regulates BDNF expression at the level of transcription.

To gain insight into how HBZ activates BDNF expression, we were interested in identifying domains in HBZ that mediated the effect. We established HeLa clonal cell lines that express wild-type HBZ or HBZ mutants (HBZ-MutAD, HBZ-MutZIP, and HBZ- Δ ATG) or that carry the empty expression vector (pcDNA3.1). HBZ-MutAD contains point mutations in the N-terminal activation domain that suppress the interaction between HBZ and the cellular coactivators p300 and CBP (32). HBZ-MutZIP contains point mutations in the C-terminal leucine zipper (ZIP) domain that suppress interactions between HBZ and cellular bZIP factors in the ATF/CREB and Jun families (20). Finally, HBZ- Δ ATG contains a point mutation in the start codon that prevents translation of the HBZ mRNA (33), as a previous study correlated enhanced cellular survival with the HBZ mRNA rather than the protein (9). Among these cell lines, we found that relative BDNF mRNA levels were elevated with wild-type HBZ or HBZ-MutAD but not with HBZ-MutZIP or HBZ- Δ ATG (Fig. 2A). These data show that BDNF activation occurs through the HBZ protein and that the ZIP domain of HBZ is essential for this effect.

The clonal cell lines initially analyzed expressed the splice 1 variant of HBZ (HBZ-S1), which is expressed predominantly in ATL cells (34). We were also interested in testing whether the unspliced variant of HBZ (HBZ-US) similarly activated BDNF expression. Using HeLa cells, we established clonal cell lines expressing HBZ-US and found that these cells contained elevated levels of BDNF mRNA relative to cells carrying the empty vector (Fig. 2B).

Given that HBZ interacts with multiple cellular proteins that regulate transcription, we expected HBZ to activate transcription from the BDNF promoter. However, in reporter assays, the promoter of the BDNF-IV gene proved to be unresponsive to HBZ (data not shown), suggesting that HBZ functions through an alternative mechanism. In addition to regulation through the promoter, BDNF expression is controlled by an antisense transcript and a small interfering RNA that targets the 3' untranslated region (3' UTR) (35, 36). We found that HBZ did not affect either of these pathways (data not shown). To test whether the increase in BDNF mRNA was due to stabilization of the transcript, we used actinomycin D to block transcription elongation (37). This treatment led to a slight decrease in the BDNF mRNA half-life in the presence of HBZ (1.3 h versus 1.5 h in cells with pcDNA3.1 alone) (Fig. 3A), demonstrating that HBZ does not stabilize the transcript.

We additionally performed ChIP assays to test for markers of active transcription across the BDNF gene. We found that the HeLa clones carrying the empty vector or expressing HBZ each showed a peak of acetyl-histone H3 enrichment at the BDNF-IV promoter and just downstream of the BDNF-IV transcription start site (Fig. 3B). Enrichment of this histone mark was greater in the cells expressing HBZ. Furthermore, cells expressing HBZ exhibited greater enrichment of RNA polymerase II at the two BDNF-IV downstream sites than that in cells carrying the empty vector (Fig. 3C). These data provide evidence for transcriptional regulation of BDNF by HBZ.

HTLV-1-infected T-cell lines express TrkB. Our findings that HTLV-1-infected T cells produce BDNF led us to test whether these cells also express the BDNF receptor, TrkB. We first compared levels of TrkB mRNA among uninfected T-cell lines, HTLV-1-infected T-cell lines, and primary CD4⁺ T cells from a healthy donor. Because multiple TrkB transcript variants exist, we initially analyzed total TrkB mRNA levels through the use of a real-time PCR primer set that targets all of the variants. In this analysis, each of the HTLV-1-infected T-cell lines exhibited significantly more total TrkB expression than that in the uninfected T-cell lines and the primary T cells (Fig. 4A). A subset of the TrkB transcript variants lack exons encoding the tyrosine kinase domain that is associated with prosurvival signaling (38). Using real-time PCR primers that selectively target transcripts encoding the kinase domain (TrkB-TK⁺), we found that levels of these transcripts were significantly elevated in the HTLV-1-infected T-cell lines compared to the uninfected CD4⁺ T cells (Fig. 4B). Furthermore, we were able to detect the full-length TrkB (TrkB-TK⁺) protein in total membrane fractions from HTLV-1-infected cells but not from Jurkat cells (Fig. 4C).

We then performed indirect immunofluorescence microscopy to analyze the distribution of TrkB in HTLV-1-infected cells. Using C10/MJ cells, we found that most of the TrkB appeared to localize to the cell surface and, importantly, that BDNF similarly localized at the cell surface (Fig. 4D). Based on this observation, we tested whether the TrkB receptor was stimulated in these cells, as stimulation of TrkB-TK⁺ through binding of BDNF leads to autophosphorylation of the receptor. Consistent with the immunofluorescence data, we detected TrkB phosphorylation (Fig. 4E, lane 1). Furthermore, treatment of cells with the TrkB antagonist ANA-12 (39) abolished this modification (Fig. 4E, lane 2). These results indicate that mature BDNF produced by cells binds to and activates the TrkB receptor.

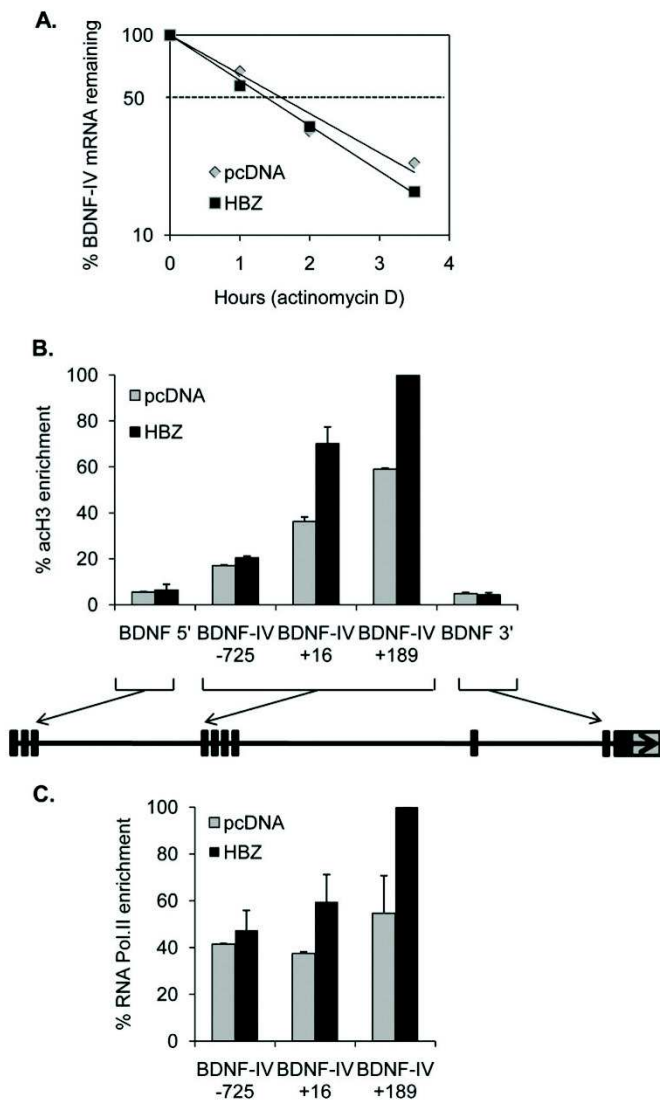


FIG 3 HBZ activates the promoter of BDNF-IV. (A) BDNF mRNA stability in HeLa clonal cell lines expressing HBZ-S1 or carrying the empty vector. The graph shows real-time PCR analysis of cDNA prepared from actinomycin D-treated cells for the indicated times, normalizing BDNF amplification to β -actin amplification. BDNF mRNA levels were set to 100% at 0 h for both cell lines, and data were averaged from two independent experiments. (B) Levels of histone H3 acetylation (acH3) enrichment over that of the BDNF gene in cells expressing HBZ-S1 or carrying the empty vector. ChIP assays were performed using an antibody directed against acH3, and relative levels of acH3 at the indicated sites were normalized to 1% of the input DNA following quantitative real-time PCR and graphed with respect to the highest level of enrichment (set to 100%). The graph shows data averaged from two independent ChIP assays. The diagram depicts the >67-kb gene, with exons indicated as rectangles. (C) Levels of RNA polymerase II (Pol.II) enrichment over that in the BDNF-IV region in cells expressing HBZ-S1 or carrying the empty vector, with data averaged from two independent ChIP assays. The middle of each amplicon is indicated with respect to the BDNF-IV transcription start site.

Expression of BDNF and TrkB is upregulated in ATL patient cells. In addition to HTLV-1-infected T-cell lines, we analyzed BDNF and TrkB expression in CD8⁺-depleted cells isolated from HAM/TSP (HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; a separate HTLV-1-associated disease) and acute ATL patients and from asymptomatic carriers (AC) (Table 1). We found that rel-

ative BDNF mRNA levels were significantly higher in HAM/TSP and ATL patient samples than in AC samples (Fig. 5A). This observation was associated with elevated levels of HBZ mRNA in both sets of patient samples compared to the AC samples (Fig. 5C). In addition to BDNF, TrkB mRNA levels were significantly higher in ATL samples than in AC samples, while, in contrast, no significant difference in TrkB expression was observed between HAM/TSP and AC samples (Fig. 5B).

We additionally evaluated serum concentrations of BDNF in patients and noninfected individuals (NI). In this analysis, acid treatment of samples yielded detection of both pro- and mature BDNF, while only mature BDNF was detectable in untreated samples (see Materials and Methods). Analysis of acid-treated samples showed that serum concentrations of BDNF were similar between the NI and HAM/TSP groups but were significantly elevated in the ATL group (Fig. 5D). Similar results were obtained when samples were left untreated (Fig. 5E), suggesting that most serum BDNF is the mature form. Overall, these results show that ATL patient cells possess the necessary components for BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling.

A BDNF/TrkB autocrine/paracrine loop promotes survival of HTLV-1-infected cells. Evidence of BDNF and TrkB colocalization at the cell surface and phosphorylation of TrkB suggested that a BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling loop was active in infected cells. To test this hypothesis, we analyzed the effects of small-molecule inhibitors of BDNF/TrkB signaling on the survival of cells stressed by serum starvation. K-252a is a tyrosine kinase inhibitor that specifically targets the Trk receptor family at low concentrations (40) (see Fig. 7B). Effects of K-252a were initially evaluated on C10/MJ cells, as these cells contained intermediate levels of BDNF and TrkB-TK⁺ RNAs in the panel of HTLV-1-infected cells that we tested. Following treatment of the cells with K-252a, we observed a significant increase in cell death at drug concentrations of 100 and 200 nM relative to that with the DMSO vehicle control (Fig. 6A). These effects were independent of the culture conditions (normal serum versus serum-starved conditions), although serum-starved cells additionally exhibited increased death at a K-252a concentration of 50 nM (Fig. 6A). It is important that the K-252a concentrations we used were the same as or lower than those used to inhibit TrkB signaling in other studies (see reference 18). However, to confirm that these results were specifically due to inhibition of this pathway, we also employed a TrkB antagonist, ANA-12 (see Fig. 7B). Using indirect immunofluorescence microscopy, we observed an apparent reduction in BDNF at cell surfaces in the presence of ANA-12 (39) (Fig. 6B). In serum-starved cultures, ANA-12 induced a significant increase in cell death compared to that with DMSO (Fig. 6C).

We were also interested in testing whether K-252a and ANA-12 increased cell death in ATL-2s cells. While C10/MJ cells were established using an *in vitro* coculture approach, ATL-2s cells were derived directly from an ATL patient and therefore may be more physiologically similar to ATL patient cells. Overall, these cells proved to be more sensitive to culture conditions, as they exhibited more background cell death than C10/MJ cells. Treatment with either K-252a or ANA-12 led to a significant increase in cell death that was independent of serum concentrations in the culture (Fig. 6D).

To confirm that these inhibitors did not influence survival in the absence of TrkB, we analyzed Jurkat cells as well as the empty vector-carrying and HBZ-expressing clonal cell lines that were

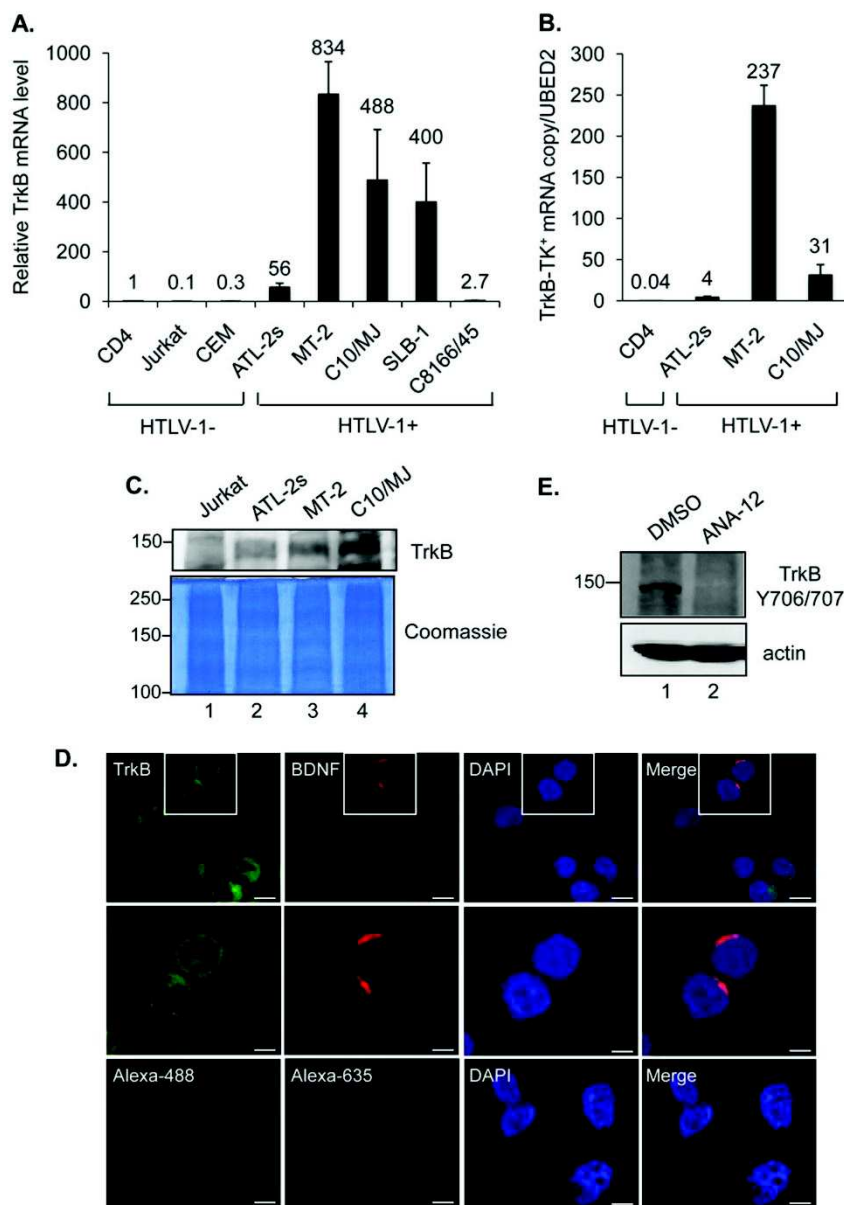


FIG 4 HTLV-1-infected T cells express TrkB. (A) Total expression of all TrkB variants in uninfected and HTLV-1-infected T cells. The graph shows real-time PCR results as described in the legend to Fig. 2A, obtained using TrkB primers. Values correspond to three independent experiments and were calculated relative to data for the CD4⁺ cells (set to 1). (B) Expression of TrkB variants containing the tyrosine kinase domain (TrkB-TK⁺) in CD4⁺ and HTLV-1-infected T cells. The graph shows TrkB-TK⁺ mRNA copy numbers normalized to one copy of UBE2D2 mRNA. Values correspond to two independent experiments. (C) Expression of the full-length TrkB protein in HTLV-1-infected cells. Western blot analysis was performed to detect TrkB in total membrane preparations from Jurkat cells and HTLV-1-infected T-cell lines. The membrane in the upper panel was probed with a TrkB antibody. The lower panel shows the same samples stained with Coomassie blue. (D) Colocalization of TrkB and BDNF on the surfaces of HTLV-1-infected C10/MJ cells. Cells were analyzed by indirect immunofluorescence microscopy (magnification, $\times 40$; Zeiss LSM 700 microscope) using TrkB and BDNF antibodies or with secondary antibodies alone (lower panels). Nuclei were stained with DAPI. Bars, 10 μm (upper panels) and 5 μm (middle and lower panels). (E) Western blot detection of phosphorylated TrkB in C10/MJ cells treated with DMSO or the TrkB antagonist ANA-12 (20 μM) prior to preparation of whole-cell extracts. The membrane in the upper panel was probed with a phosphorylation-specific TrkB antibody. The lower panel shows the same membrane stripped and reprobed with an actin antibody.

established from Jurkat cells. The only significant effect of either compound was observed in Jurkat cells, which exhibited a slight increase in death in 10% serum cultures treated with K-252a (Fig. 7A). These results support a prosurvival role for TrkB autocrine/paracrine signaling in HTLV-1-infected T cells.

Finally, we were interested in confirming whether downstream signaling occurs in HTLV-1-infected T cells in response to activation of TrkB by mature BDNF. The downstream effects of BDNF

have been characterized extensively for neurons and the brain. In these systems, active GSK-3 β opposes the effects of BDNF (41), and consequently, certain signaling pathways downstream of TrkB converge on inactivation of GSK-3 β , in part through phosphorylation of its serine 9 residue. In the context of T cells, active GSK-3 β is associated with cell death following activation, while inhibition of the enzyme increases activated T-cell survival (42). Based on this information, we compared the effects of ANA-12

TABLE 1 Clinical features of ATL patients

Patient no.	Sex	Age (yr)	Subtype at diagnosis	Cytogenetics ^a	% ATL cells	Presence of hypercalcemia
1	Female	61	Acute	Tetraploidy	78	Yes
2	Female	50	Acute	Tetraploidy	55	No
3	Female	44	Acute	del6, der7, add8, add13, der14, del18	65	No
4	Male	68	Acute	der1, add2, +2, add4, der7, +7, add10, +10	70	Yes

^a del, deletion; der, derivative chromosome; add, additional material of unknown origin; +, gain of a chromosome.

and K-252a on GSK-3 β serine 9 phosphorylation in Jurkat and HTLV-1-infected T-cell lines. We found that the level of GSK-3 β phosphorylation was higher in Jurkat cells than in HTLV-1-infected cells, and both drugs caused a slight increase in the level of phosphorylation in these cells (Fig. 8A). In contrast, both ANA-12 and K-252a reduced the levels of GSK-3 β phosphorylation in the three HTLV-1-infected T-cell lines that were tested (Fig. 8A).

One important function of GSK-3 β is to phosphorylate β -catenin and mark it for degradation (43). Interestingly, inhibition of this process is expected to lead to the survival of Treg cells through stabilization of β -catenin (44), which may relate to recent similarities described between ATL and Treg cells (45). We used a luciferase assay to test whether the drug-induced dephosphorylation of GSK-3 β was associated with a decrease in transcription activated by β -catenin. C10/MJ cells were transfected with p7LEF-Fos-Luc, which is activated through formation of an LEF1/ β -catenin complex (22). We found that ANA-12 caused a significant decrease in luciferase activity (Fig. 8B), suggesting that dephos-

phorylation, and therefore reactivation, of GSK-3 β contributes to a reduction in β -catenin activity. These observations correlate enhanced survival through BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling with GSK-3 β inactivation in HTLV-1-infected T-cell lines.

DISCUSSION

In this study, we found that the protein encoded by the HTLV-1 antisense gene, HBZ, activates expression of the neurotrophin BDNF. In addition, we found that HTLV-1-infected T cells express high levels of TrkB, which serves as the high-affinity receptor for BDNF. In addition to its central role in neuronal survival, the interaction between BDNF and TrkB is believed to facilitate T-cell development. Survival of immature thymocytes has been reported to involve constitutive expression of TrkB, which is activated by BDNF produced from thymic stromal cells (46). However, as these early thymocytes progress through stages of differentiation, TrkB expression declines (46). In circulating T cells, it is unclear whether BDNF/TrkB signaling is significant, as either these cells

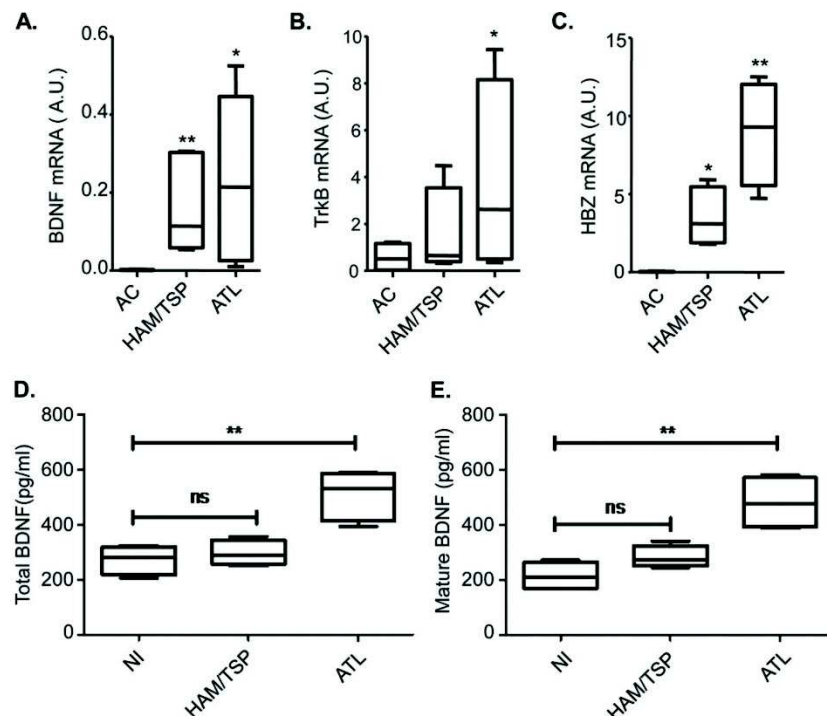


FIG 5 Comparison of BDNF and TrkB expression among samples from HAM/TSP and ATL patients and asymptomatic carriers. Box plots show mRNA levels of BDNF (A), TrkB (B), and HBZ (C), expressed in arbitrary units (A.U.), in CD8⁺-depleted PBMCs from asymptomatic carriers (AC) and HAM/TSP and ATL patients following 5 days of culture (4 samples per group). Horizontal lines from the bottom to the top of each plot show the minimum value, the 25th percentile, the median, the 75th percentile, and the maximum value. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ (two-tailed Student t test). The TrkB and BDNF primers used for real-time PCR amplified all transcript variants. (D and E) BDNF concentrations in acid-treated (D) and untreated (E) specimens. Box plots show ELISA results for sera from noninfected individuals (NI) and HAM/TSP and ATL patients (4 samples per group), using the same plot indices as those described above.

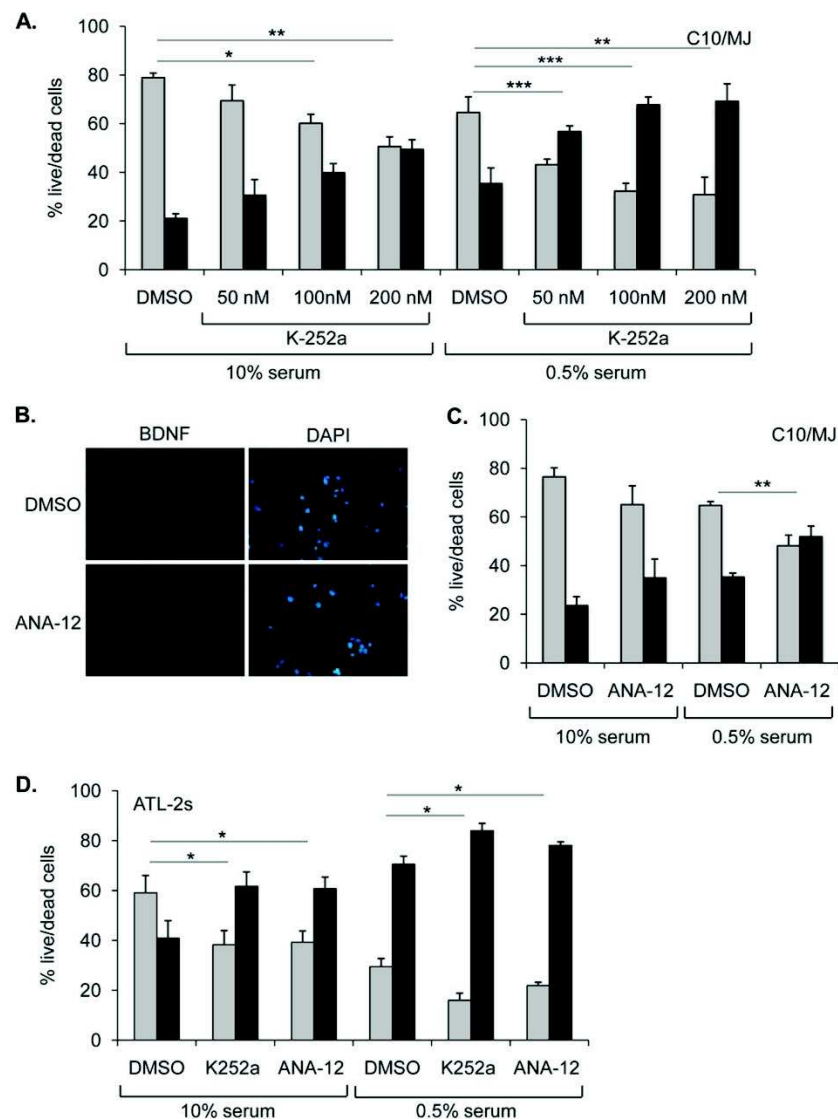


FIG 6 Inhibition of TrkB signaling induces death of HTLV-1-infected cells. (A) C10/MJ cell survival following K-252a treatment. The graph shows ratios of live (light gray bars) to dead (dark gray bars) cells (transformed to 100% total cells) following the indicated culture conditions and treatments. Values are the mean data from three or more independent experiments, with error bars denoting standard deviations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0005$ (two-tailed Student t test). (B) ANA-12 reduces binding of BDNF antibody to the surfaces of C10/MJ cells. Cells were seeded on coverslips in the presence of ANA-12 or DMSO and analyzed by indirect immunofluorescence microscopy (magnification, $\times 40$; Nikon Eclipse E600 microscope) using a BDNF antibody. Nuclei were stained with DAPI. (C) C10/MJ cell survival following ANA-12 (20 μM) treatment. The graph shows ratios of live to dead cells as detailed above. Values are the mean data from three independent experiments, with error bars denoting standard deviations. **, $P < 0.01$ (two-tailed Student t test). (D) ATL-2s cell survival following K-252a (100 nM) and ANA-12 (20 μM) treatment. The graph shows ratios of live to dead cells as detailed above. Values are the mean data from three independent experiments, with error bars denoting standard deviations. *, $P < 0.01$ (two-tailed Student t test).

do not express TrkB or its expression is mainly restricted to Th1 cells (47, 48). BDNF expression in T cells is similarly disputed and has been analyzed in the context of a direct role played by the immune system in repair of neuronal damage rather than for T-cell survival (47–50). It is possible that induced BDNF expression is restricted to T-helper subtypes and depends on antigen-mediated activation of these cells (51). Our results indicate that CD8^+ -depleted PBMCs from healthy donors and asymptomatic HTLV-1 carriers do not express BDNF and express only low levels of TrkB, suggesting that BDNF/TrkB signaling does not support the survival of these cells.

A different pattern emerged for CD8^+ -depleted PBMCs from

ATL patients. These cells contained elevated levels of BDNF and TrkB mRNAs, and additionally, ATL patients exhibited high serum concentrations of BDNF. This trend of elevated BDNF and TrkB expression extended to T-cell lines transformed with HTLV-1. Furthermore, these cell lines showed evidence of active BDNF/TrkB autocrine/paracrine signaling, which served to enhance their survival. Members of the Trk receptor family were originally characterized as oncogenes, and TrkB/BDNF signaling, specifically, is known to contribute to the survival of certain types of tumor and leukemic cells (18, 19). For example, activation of TrkB induces resistance to chemotherapeutic agents in neuroblastoma cells (52, 53). Therefore, BDNF/TrkB autocrine/paracrine

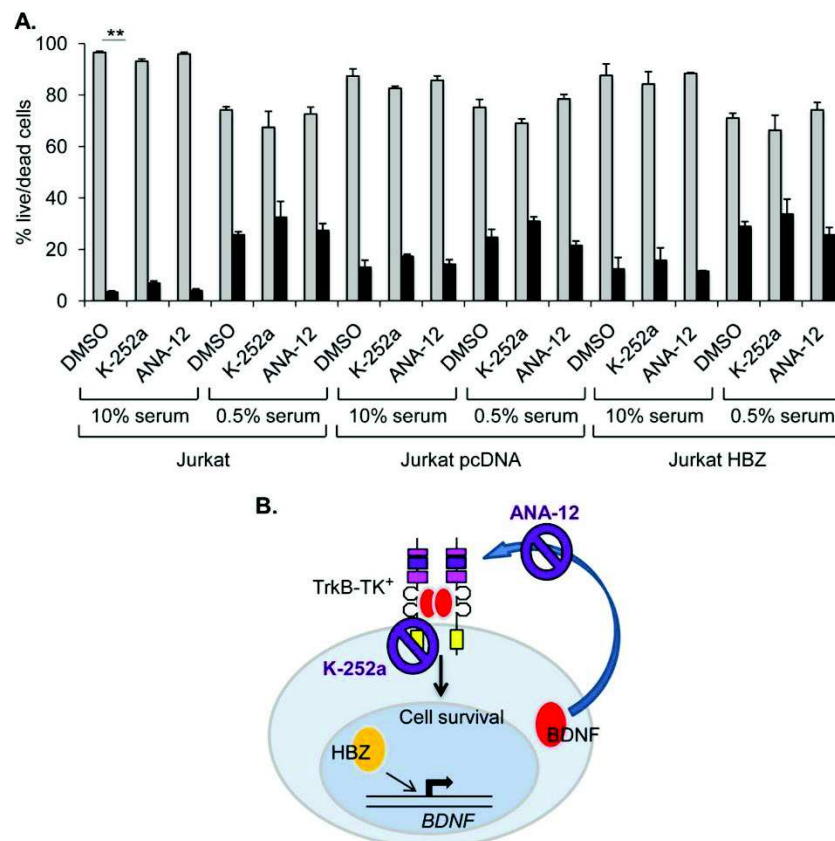


FIG 7 Cell survival of Jurkat cells and Jurkat clones following K-252a and ANA-12 treatment. (A) Jurkat-pcDNA and Jurkat-HBZ cell survival following K-252a (100 nM) or ANA-12 (20 μ M) treatment. The graph shows ratios of live (light gray bars) to dead (dark gray bars) cells (transformed to 100% total cells) following the indicated culture conditions and treatments. Values are the mean data from three independent experiments, with error bars denoting standard deviations. **, $P < 0.01$ (two-tailed Student t test). (B) Schematic showing the modes of inhibition of BDNF/TrkB signaling by K-252a and ANA-12.

signaling in HTLV-1-infected T cells may be one of the factors underlying the overall ineffectiveness of chemotherapeutic treatments for ATL. This premise takes into account our finding that HBZ activates BDNF expression and previous data showing that HBZ is commonly the only viral protein expressed in cells from ATL patients (5).

Culture media from some HTLV-1-infected cells contained pro-BDNF in addition to the mature form of the protein. While pro-BDNF has been reported to stimulate TrkB (54), it also interacts with p75^{NTR} independently of TrkB, which in neurons and a limited number of other cell types induces apoptosis (31). It is unclear whether pro-BDNF produces a similar effect on HTLV-1-infected cells, as activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) is essential for apoptotic signaling through p75^{NTR} in cultured neurons (55). During HTLV-1 infection of T cells, JNK is activated, and this has been associated with the immortalization of infected T cells rather than cell death (56), suggesting that these cells may be resistant to the apoptotic effects of pro-BDNF. Interestingly, the Tax protein is implicated in JNK activation and is also known to inhibit a variety of apoptotic signals (57). It is therefore possible that the presence of Tax during infection would oppose p75^{NTR} apoptotic signals. In patient sera, mature BDNF was the predominant form of the protein, and therefore, signaling through TrkB is expected to occur in HTLV-1-infected T cells in the peripheral blood.

We found that HBZ activates BDNF expression at the level of transcription. However, the BDNF-IV promoter proved to be unresponsive to HBZ in the reported assays. It is possible that this promoter does not encompass *cis*-elements affected by the viral protein, as the BDNF gene contains nine separate transcription start sites distributed over more than 60 kb of DNA (29, 30, 58, 59). Alternatively, HBZ may activate transcription through a distal enhancer. This hypothesis is based on our frequent observations that while HBZ may activate expression of a particular endogenous cellular gene, it does not activate transcription from the promoter of that gene in the context of a reporter construct (20; unpublished data). Our data indicate that HBZ regulates BDNF transcription through an interaction with a cellular bZIP factor. Upon associating with HBZ, most bZIP factors are blocked from binding DNA and activating transcription, with JunD serving as the exception (60). Indeed, a complex consisting of HBZ, JunD, and Sp1 has been shown to positively regulate transcription (13, 61). Based on this observation and recent evidence that Sp1 functions at enhancers (62), it is possible that an HBZ/JunD/Sp1 complex is involved in the activation of BDNF expression.

Elevated TrkB levels in HTLV-1-infected T cells were not directly associated with the activities of HBZ or Tax. Indeed, HBZ-expressing clonal cell lines did not exhibit significant differences in TrkB expression compared to cell lines carrying the empty expression vector, and transient cellular expression of Tax did not

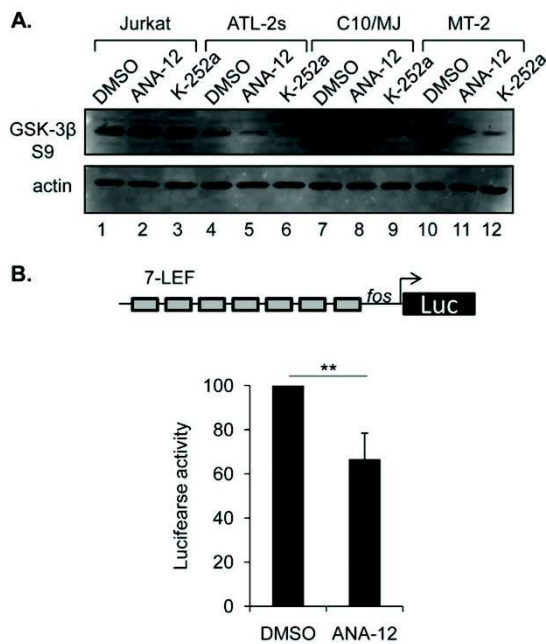


FIG 8 Inhibition of BDNF/TrkB signaling decreases downstream phosphorylation of GSK-3 β . (A) The Western blot in the upper panel shows detection of serine 9 phosphorylation of GSK-3 β in the indicated cell lines treated with DMSO, ANA-12 (20 μ M), or K-252a (100 nM). Cells were cultured with 0.5% FBS for 24 h and then received the indicated drug treatments for 6 h. The lower panel shows the same membrane stripped and then probed for actin. (B) ANA-12 treatment restores GSK-3 β activity. C10/MJ cells were transfected with p7LEF-Fos-Luc and pRL-SV40-Luc (internal standard), cultured in 0.5% serum, and treated with DMSO or 20 μ M ANA-12. The graph shows data from four independent transfection assays, with values showing the average luminescence normalized to that of the DMSO treatment (set to 100). **, $P < 0.005$ (two-tailed Student t test).

affect TrkB mRNA levels (data not shown). Furthermore, levels of Tax expression did not correlate with levels of TrkB expression in patient samples (data not shown). Therefore, the mechanism responsible for TrkB expression in the infected cells is unclear. Considering the known oncogenic properties of TrkB, it would be interesting to identify the cellular and/or viral components responsible for activating and sustaining its expression during HTLV-1 infection. It is interesting that in rabbits inoculated with HTLV-1, *gag/pol* and *tax/rex* transcripts were shown to be initially high in PBMCs but then declined and eventually became undetectable (63). In contrast, *hbz* transcript levels increased and eventually stabilized, which paralleled changes in the number of infected cells (63). These observations implicated HBZ in survival of infected cells in rabbits. Taking that study into account, it is possible that TrkB expression is regulated by a combination of events occurring during early HTLV-1 infection and that later expression of HBZ then implements the full BDNF signaling loop.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Public Health Service grant CA128800 from the National Cancer Institute.

We thank M. E. Greenberg for the BDNF luciferase construct, M. Matsuoka for the ATL-2s cells, P. L. Green for the shRNA-HBZ vector, and R. A. Schwalbe for technical advice on protein membrane preparation.

REFERENCES

- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058–6068. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208968>.
- Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. 2012. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front. Microbiol.* 3:322. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00322>.
- Fields PA, Taylor GP. 2012. “Antivirals” in the treatment of adult T cell leukaemia-lymphoma (ATLL). *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 7:267–275. <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-012-0139-9>.
- Marriott SJ, Semmes OJ. 2005. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 24:5986–5995. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208976>.
- Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y, Matsuoka M. 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* 109:559–567. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20007>.
- Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S, Watanabe T. 2002. 5'-Long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 76:9389–9397. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.18.9389-9397.2002>.
- Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, Maeda M, Mueller N, Okayama A, Matsuoka M. 2005. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* 2:64. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-2-64>.
- Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.24.12813-12822.2002>.
- Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507631103>.
- Cavanagh M, Landry S, Audet B, Arpin-Andre C, Hivin P, Pare M-E, Thete J, Wattel E, Marriott SJ, Barbeau B, Mesnard J-M. 2006. HTLV-I antisense transcripts initiate in the 3'LTR and are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* 3:15. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-3-15>.
- Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, Hasegawa H, Tsuruda K, Okazaki T, Koji T, Miyanishi T, Yamada Y, Kamihira S. 2006. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J. Virol.* 80:2495–2505. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.5.2495-2505.2006>.
- Miyazaki M, Yasunaga J, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M. 2007. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J. Virol.* 81:5714–5723. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02511-06>.
- Gazon H, Lemasson I, Polakowski N, Cesaire R, Matsuoka M, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM, Jr. 2012. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP factor requires cellular transcription factor JunD to upregulate HTLV-1 antisense transcription from the 3' long terminal repeat. *J. Virol.* 86:9070–9078. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00661-12>.
- Arnold J, Zimmerman B, Li M, Lairmore MD, Green PL. 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112:3788–3797. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-154286>.
- Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. 2011. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 7:e1001274. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001274>.
- Barbeau B, Peloponese JM, Mesnard JM. 2013. Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. *Front. Microbiol.* 4:226. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00226>.
- Chao MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:299–309. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1078>.
- Li Z, Beutel G, Rhein M, Meyer J, Koenecke C, Neumann T, Yang M, Krauter J, von Neuhoff N, Heuser M, Diedrich H, Gohring G, Wilkens

- L, Schlegelberger B, Ganser A, Baum C. 2009. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 113:2028–2037. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-05-155200>.
19. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. 2009. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res.* 15:5962–5967. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0651>.
 20. Polakowski N, Gregory H, Mesnard JM, Lemasson I. 2010. Expression of a protein involved in bone resorption, Dkk1, is activated by HTLV-1 bZIP factor through its activation domain. *Retrovirology* 7:61. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-61>.
 21. Wurm T, Wright DG, Polakowski N, Mesnard JM, Lemasson I. 2012. The HTLV-1-encoded protein HBZ directly inhibits the acetyl transferase activity of p300/CBP. *Nucleic Acids Res.* 40:5910–5925. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks244>.
 22. Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. 1998. Modulation of transcriptional regulation by Lef-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol. Cell Biol.* 18:4807–4818.
 23. Cook PR, Polakowski N, Lemasson I. 2011. HTLV-1 HBZ protein de-regulates interactions between cellular factors and the KIX domain of p300/CBP. *J. Mol. Biol.* 409:384–398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.003>.
 24. Belrose G, Gross A, Olindo S, Lezin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard JM, Peloponese JM, Jr, Cesaire R. 2011. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood* 118:2483–2491. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-11-321364>.
 25. Lemasson I, Nyborg JK. 2001. Human T-cell leukemia virus type I Tax repression of p73beta is mediated through competition for the C/11 domain of CBP. *J. Biol. Chem.* 276:15720–15727. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100131200>.
 26. Hall MK, Weidner DA, Bernetski CJ, Schwalbe RA. 2014. N-linked glycan site occupancy impacts the distribution of a potassium channel in the cell body and outgrowths of neuronal-derived cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1840:595–604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.025>.
 27. Polakowski N, Han H, Lemasson I. 2011. Direct inhibition of RNase T2 expression by the HTLV-1 viral protein Tax. *Viruses* 3:1485–1500. <http://dx.doi.org/10.3390/v3081485>.
 28. Lemasson I, Polakowski N, Laybourn PJ, Nyborg JK. 2004. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol. Cell Biol.* 24:6117–6126. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.14.6117-6126.2004>.
 29. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90:397–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>.
 30. Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T, Nakagawara A. 2001. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* 164:51–60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00715-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00715-1).
 31. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 25:5455–5463. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>.
 32. Clerc I, Hivin P, Rubbo PA, Lemasson I, Barbeau B, Mesnard JM. 2009. Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-1 to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology* 391:195–202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.027>.
 33. Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, Hivin P, Cavanagh MH, Thebault S, Barbeau B, Nyborg JK, Mesnard JM. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00480-06>.
 34. Usui T, Yanagihara K, Tsukasaki K, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. 2008. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* 5:34. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-5-34>.
 35. Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, van der Brug MP, Wahlestedt C. 2012. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat. Biotechnol.* 30:453–459. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2158>.
 36. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. 2005. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310:1817–1821. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1121158>.
 37. Bensaude O. 2011. Inhibiting eukaryotic transcription: which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* 2:103–108. <http://dx.doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>.
 38. Stoilov P, Castren E, Stamm S. 2002. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:1054–1065. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.6301>.
 39. Cazorla M, Premont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. 2011. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J. Clin. Invest.* 121:1846–1857. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI43992>.
 40. Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7:371–381.
 41. Cole AR. 2012. GSK3 as a sensor determining cell fate in the brain. *Front. Mol. Neurosci.* 5:4. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2012.00004>.
 42. Sengupta S, Jayaraman P, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. 2007. Unrestrained glycogen synthase kinase-3 beta activity leads to activated T cell death and can be inhibited by natural adjuvant. *J. Immunol.* 178:6083–6091. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6083>.
 43. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10:1443–1454. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.10.12.1443>.
 44. Ding Y, Shen S, Lino AC, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. 2008. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces energy in nonregulatory T cells. *Nat. Med.* 14:162–169. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1707>.
 45. Miyazato P, Matsuoka M. 2014. Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression: viral strategy in vivo. *Int. Immunol.* 26:419–425. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxu048>.
 46. Maroder M, Bellavia D, Meco D, Napolitano M, Stigliano A, Alesse E, Vacca A, Giannini G, Frati L, Gulino A, Screpanti I. 1996. Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J. Immunol.* 157:2864–2872.
 47. Besser M, Wank R. 1999. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J. Immunol.* 162:6303–6306.
 48. Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, Tuohy VK. 2004. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J. Neurosci. Res.* 77:709–717. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20176>.
 49. Xin J, Mesnard NA, Beahrs T, Wainwright DA, Serpe CJ, Alexander TD, Sanders VM, Jones KJ. 2012. CD4+ T cell-mediated neuroprotection is independent of T cell-derived BDNF in a mouse facial nerve axotomy model. *Brain Behav. Immun.* 26:886–890. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.02.011>.
 50. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann. Neurol.* 53:292–304. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.10446>.
 51. Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, Schwartz M. 2000. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmun.* 15:331–345. <http://dx.doi.org/10.1006/jaut.2000.0441>.
 52. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, Camoratto AM, Evans AE, Brodeur GM. 2002. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 62:6462–6466.
 53. Jaboin J, Hong A, Kim CJ, Thiele CJ. 2003. Cisplatin-induced cytotoxicity is blocked by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB signal transduction path in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 193:109–114. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00723-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00723-1).
 54. Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vogelín E, Kruttgen A. 2005. The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *J. Neurosci. Res.* 80:18–28. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20432>.

55. Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M. 2010. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 473:229–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.02.055>.
56. Xu X, Heidenreich O, Nerenberg M. 1996. Role of kinases in HTLV-I transformation. *J. Invest. Med.* 44:113–123.
57. Taylor JM, Nicot C. 2008. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 13:733–747. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-008-0208-7>.
58. Fang H, Chartier J, Sodja C, Desbois A, Ribocco-Lutkiewicz M, Walker PR, Sikorska M. 2003. Transcriptional activation of the human brain-derived neurotrophic factor gene promoter III by dopamine signaling in NT2/N neurons. *J. Biol. Chem.* 278:26401–26409. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211539200>.
59. Liu QR, Walther D, Drgon T, Polesskaya O, Lesnick TG, Strain KJ, de Andrade M, Bower JH, Maraganore DM, Uhl GR. 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134B:93–103. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30109>.
60. Thebault S, Basbous J, Hivin P, Devaux C, Mesnard JM. 2004. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 562:165–170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00225-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00225-X).
61. Kuhlmann AS, Villaudy J, Gazzolo L, Castellazzi M, Mesnard JM, Duc Dodon M. 2007. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4:92. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-4-92>.
62. Deshane J, Kim J, Bolisetty S, Hock TD, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. 2010. Sp1 regulates chromatin looping between an intronic enhancer and distal promoter of the human heme oxygenase-1 gene in renal cells. *J. Biol. Chem.* 285:16476–16486. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.058586>.
63. Li M, Kesic M, Yin H, Yu L, Green PL. 2009. Kinetic analysis of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression in cell culture and infected animals. *J. Virol.* 83:3788–3797. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02315-08>.

III. Discussion

La protéine HBZ du HTLV-1 joue un rôle central dans le développement et le maintien de l'ATL. En effet, c'est le seul facteur viral dont l'expression soit détectée dans 100% des cas d'ATL. De plus, HBZ stimule l'acquisition de certaines caractéristiques tumorales par la cellule infectée. La présente étude apporte de nouvelles pistes quant aux mécanismes par lesquels HBZ induit la survie et la chimiorésistance des cellules ATL.

Nous avons pu démontrer qu'HBZ stimule l'expression du gène codant pour le facteur de croissance BDNF. En fait, HBZ active la transcription à partir du promoteur de l'exon IV de *BDNF*. Toutefois, des tests effectués à l'aide d'un vecteur rapporteur indiquent que la protéine HBZ n'active pas directement le promoteur de *BDNF-IV* (données non publiées). L'absence de certaines séquences régulatrices proximales, voire distales, pourrait expliquer les résultats obtenus avec notre vecteur. D'autre part, l'ajout de modifications épigénétiques a été rapporté comme intervenant dans la régulation de l'expression de *BDNF* (West et al., 2014). Aussi, par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), nous avons pu observer un pic d'acétylation de l'histone H3 et de recrutement de l'ARNpol II au niveau du promoteur IV, témoignant de l'activation de la transcription. Cet enrichissement s'est avéré plus important dans les cellules HeLa exprimant HBZ, suggérant une possible action d'HBZ au niveau épigénétique. Nos résultats montrent que l'activation de la transcription, à partir du promoteur de l'exon IV de *BDNF*, requiert l'interaction d'HBZ avec un facteur de type bZIP. Or, JunD est le partenaire de prédilection d'HBZ. Ensemble, ils régulent positivement l'expression du gène *hbz*, en coopération avec Sp1 (Gazon et al., 2012). Sp1 étant capable de lier l'ADN et de recruter des facteurs de remodelage de la chromatine, tels que p300/CBP et SWI/SNF, le complexe HBZ/JunD/Sp1 pourrait intervenir dans l'activation de la transcription de *BDNF* (Wierstra, 2008).

Outre son rôle dans le développement, le maintien, et la plasticité du système nerveux, l'axe BDNF/TrkB intervient dans le développement des lymphocytes T au sein du thymus. En effet, les cellules stromales y sécrètent la neurotrophine BDNF, soutenant ainsi la survie des thymocytes immatures qui expriment alors TrkB. Une fois le processus de différenciation achevé, l'expression de TrkB serait majoritairement éteinte dans les lymphocytes T (Maroder et al., 1996). Quant à l'expression de BDNF dans les cellules T, elle serait induite suite à la présentation antigénique (Kerschensteiner et al., 2003). Dans cette étude, l'expression de BDNF et de son récepteur TrkB était faible, voire indétectable, chez les donneurs sains et les porteurs asymptomatiques du virus, suggérant l'indépendance, vis-à-vis de l'axe BDNF/TrkB, de ces cellules pour leur survie. Par contre, nous avons pu détecter une forte expression de BDNF et de TrkB, dans les PBMCs déplétés en cellules CD8⁺ de patients atteints d'ATL aiguë, confirmant nos résultats obtenus dans les lignées T chroniquement infectées par HTLV-1. De plus, la présence d'une concentration élevée de la forme mature de BDNF, dans le sérum de ces patients, va dans le sens d'une sécrétion autocrine ou paracrine de BDNF. Aussi, nous avons contrôlé l'activation de TrkB-TK⁺ dans les cellules T infectées par HTLV-1 et démontré l'importance d'une boucle autocrine/paracrine BDNF/TrkB dans la survie de ces cellules. Etant donné l'implication de la voie BDNF/TrkB dans la survie et la chimiorésistance de certains types de cellules tumorales et leucémiques, il est possible que l'activation de cette voie de signalisation par HBZ soit en partie responsable de l'échec des traitements actuels de l'ATL (Li et al., 2009b; Thiele et al., 2009). La boucle autocrine/paracrine BDNF/TrkB pourrait donc constituer une cible de choix pour l'amélioration des chances de survie et de rémission des patients ATL.

Article 2 : HBZ transforme le suppresseur de tumeur JunD en promoteur de tumeur en inhibant l'expression de la protéine ribosomale RPS25 (manuscrit en préparation)

HBZ-mediated shift of JunD from growth suppressor to tumor promoter by inhibition of ribosomal protein S25 expression. **Marie Terol**, Hélène Gazon, Isabelle Lemasson, Madeleine Duc Dodon, Benoit Barbeau, Raymond Césaire, Jean-Michel Mesnard, Jean-Marie Péloponèse.

I. Introduction : JunD, un acteur majeur de la transformation cellulaire induite par *hbz*

Les dimères Jun/Jun et Jun/Fos, de la superfamille AP-1, interviennent dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes cellulaires et jouent un rôle déterminant dans la prolifération, la survie, et la transformation cellulaire. Outre la présence d'un domaine bZIP, nécessaire à leur dimérisation et à leur liaison à l'ADN, certains facteurs de transcription Jun et Fos disposent d'un puissant domaine de trans-activation, associé à une forte capacité transformante. C'est le cas des protéines c-Fos, FosB, et c-Jun.    l'inverse, JunB et JunD présentent une activité trans-activatrice faible, en comparaison à celle de c-Jun, et agissent plutôt comme suppresseurs de tumeur. Quant aux protéines Fra-1 et Fra-2, elles sont d  nu  es de domaine de trans-activation et présentent une faible activité oncogène *in vitro*. Néanmoins, leur surexpression s'accompagne du développement de tumeurs chez la souris, suggérant qu'elles pourraient compenser l'absence de ce domaine en s'association avec d'autres facteurs AP-1. En effet, il a été montré que la nature et l'intensité de la réponse AP-1 dépend en partie du contexte cellulaire et de la composition des dimères AP-1 (Eferl and Wagner, 2003).

Les cellules T primaires, isol  es de patients atteints d'ATL, présentent une activité AP-1 constitutive. De plus, l'ARNm de *junD* y est surexprimé et les complexes AP-1 contiennent principalement le facteur de transcription JunD (Mori et al., 2000). Aussi, le rôle de la voie de signalisation AP-1 dans le développement de l'ATL a-t-il été étudié. Bien que la protéine Tax du HTLV-1 soit capable d'activer la voie AP-1 dans les cellules T infect  es, son expression est rarement d  tect  e chez les patients ATL, suggérant l'intervention d'autres facteurs viraux et/ou cellulaires (Hall and Fujii, 2005). Or, il a été montré que le facteur viral HBZ, dont l'expression est constitutive dans les cellules ATL, s'h  t  rodim  rise avec les protéines c-Jun, JunB, et JunD, *via* leur domaine ZIP, et module leur activité transcriptionnelle (Basbous et al., 2003; Thébault et al., 2004). Par contre, HBZ ne s'associe pas à c-Fos, ce qui n'est pas surprenant étant donné qu'il s'agit d'un facteur de type c-Fos et que les membres Fos ne s'homodim  risent pas (Matsumoto et al., 2005). De par son interaction avec c-Jun et JunB, HBZ diminue leur capacité de liaison à l'ADN (Basbous et al., 2003). De plus, il induit leur séquestration dans des zones transcriptionnellement inactives, appel  es « HBZ-nuclear bodies » (Clerc et al., 2009; Hivin et al., 2007). Enfin, HBZ promeut la dégradation protéasomale du facteur c-Jun, sans nécessiter sa polyubiquitination préalable mais en interagissant directement avec le protéasome 26S (Isono et al., 2008; Matsumoto et al., 2005). HBZ réprime donc la transcription des gènes ciblés par c-Jun et JunB.

De manière surprenante, HBZ a été décrit comme stimulant l'activité transcriptionnelle de JunD (Thébault et al., 2004). En coopérant avec ce facteur AP-1, HBZ induit sa propre expression, ainsi que celle du facteur anti-apoptotique Bfl-1 et du gène hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (Gazon et al., 2012; Kuhlmann et al., 2007; Macaire et al., 2012). Par ailleurs, des résultats, récemment obtenus dans notre laboratoire, montrent qu'HBZ

stimule l'expression de JunD et que celle-ci corrèle avec l'observation d'une transformation cellulaire accrue *in vitro* (Gazon et al., 2012). Dans cette étude, des fibroblastes murins immortalisés NIH3T3 ont été transfectés avec le clone moléculaire K30-3'/4089, dépourvu de LTR5' et donc semblable à un type de provirus déficient observé dans la plupart des échantillons cellulaires de patients ATL (Tamiya et al., 1996). Les expériences de prolifération et de croissance en milieu semi-solide ont montré que les cellules NIH3T3, co-exprimant *hbz* (à partir du clone moléculaire K30-3'/4089) et *junD*, prolifèrent mieux en l'absence de facteurs de croissance et présentent des caractéristiques de cellules transformées, après une période de latence (Gazon et al., 2012). L'extinction de l'expression de *junD* par ARN interférence, annulait ces effets. Aussi, JunD semble être un acteur cellulaire important de la transformation cellulaire induite par *hbz*.

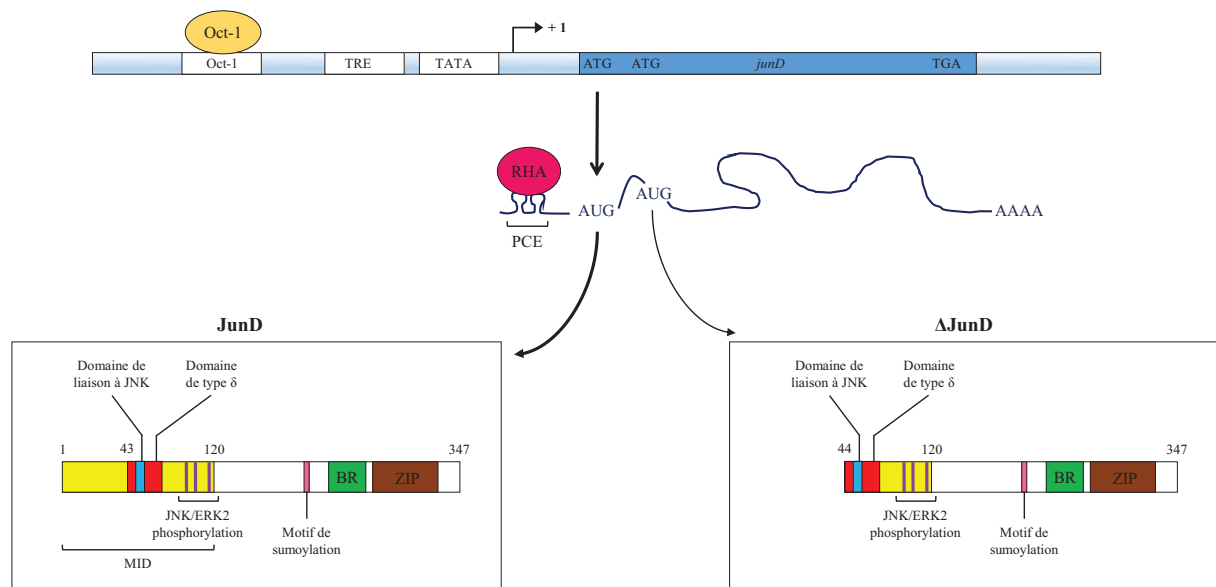


Figure 13 : Transcription et traduction du gène humain *junD* (adapté de Hernandez et al., 2008). +1 indique le site d'initiation de la transcription de *junD*. En amont, la liaison du facteur Oct-1 (octamer-binding transcription factor 1), au niveau de la boîte du même nom, est responsable de la transcription constitutive de *junD*. La boîte TRE est reconnue par les dimères JunD/JunD et JunD/c-Fos. Ainsi, en l'absence de sérum, JunD stimule sa propre expression alors qu'en présence de facteurs de croissance, c-Fos régule négativement la transcription de *junD*. La traduction de l'ARNm de *junD* génère 2 principales isoformes, JunD et ΔJunD. JunD est plus abondamment traduite (flèche plus épaisse) que ΔJunD. L'activité de JunD est aussi régulée par l'ajout de modifications post-traductionnelles et par son interaction avec d'autres facteurs cellulaires. MID, menin interaction domain ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; BR, basic region ; ZIP, leucine zipper.

A l'inverse des autres protéines AP-1, qui stimulent la prolifération cellulaire, JunD est surtout connu comme étant un suppresseur de tumeur dont l'expression est induite en l'absence de facteurs de croissance (Hernandez et al., 2008). Le gène *junD* ne possédant pas d'intron, sa transcription donne lieu à la production d'un unique messager (Figure 13). La région 5'UTR de l'ARNm de *junD* est longue, très riche en G/C, et contient un motif PCE (post-transcriptional control element) qui est reconnu par la RHA (RNA helicase A). Cette hélicase permet de décomplexer la structure du 5'UTR et de rendre la zone accessible aux ribosomes. La traduction de *junD* génère principalement deux isoformes, JunD et ΔJunD, selon qu'elle est initiée au niveau du premier ou du second codon AUG présents dans son cadre de lecture. L'initiation de la traduction à partir du 1^{er} AUG donne lieu à la production de JunD (39 kDa), alors que celle à partir du 2^{ème} AUG génère une isoforme tronquée en N terminal, appelée ΔJunD (34 kDa), dont la fonction est inconnue (Short and Pfarr, 2002). Contrairement à JunD, ΔJunD est rarement exprimée dans les cellules normales mais est détectée dans certains cancers agressifs, de type ostéosarcome ou tumeur cervicale.

L'activité anti-tumorale de JunD repose sur son interaction avec le facteur ubiquitaire ménine, codée par le gène suppresseur de tumeur *MEN1* (multiple endocrine neoplasia type 1). En effet, il a été montré que la ménine inhibe l'activité transcriptionnelle de JunD, en empêchant la phosphorylation de JunD par JNK et ERK2 et en recrutant le complexe mSin3A/HDAC (Hernandez et al., 2008). Au contraire, en l'absence de la ménine, JunD a été décrit comme ayant une activité pro-proliférative (Agarwal et al., 2003). Etant donné l'importance de JunD dans la prolifération et la transformation des cellules T infectées par HTLV-1, il est possible qu'HBZ supprime l'effet de la ménine en interagissant avec JunD. En 2013, Borowiak et al. ont rapporté la formation d'un trimère HBZ/JunD/ménine et la levée subséquente de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de JunD par la ménine (Borowiak et al., 2013).

Dans la présente étude, nous proposons un autre mécanisme, pouvant également expliquer le passage de JunD de suppresseur à promoteur de tumeur en présence d'HBZ, impliquant cette fois-ci l'isoforme courte Δ JunD. L'isoforme Δ JunD, tronquée en N-terminal, est dépourvue de domaine d'interaction avec la ménine (MID) et pourrait donc avoir une activité tumorigène. Nos résultats indiquent que la protéine HBZ du HTLV-1 dérégule l'expression de *junD* dans les cellules T infectées et induit celle de Δ JunD. La production de l'isoforme Δ JunD découlerait d'une altération des mécanismes d'initiation de la traduction, en partie *via* l'inhibition de l'expression de la protéine ribosomale RPS25 par HBZ. Dans cette étude, il a également été démontré que, contrairement à JunD seul, Δ JunD induit la prolifération et la transformation cellulaire *in vitro* en l'absence de sérum. Nous proposons donc que l'isoforme Δ JunD a une activité tumorigène intrinsèque et que son expression est déterminante dans le développement de l'ATL.

II. Article

HBZ-mediated shift of JunD from growth suppressor to tumor promoter by inhibition of ribosomal protein S25 expression

Marie Terol^{1,2}, Hélène Gazon^{2,3}, Isabelle Lemasson⁴, Madeleine Duc Dodon⁵,
Benoit Barbeau⁶, Raymond C  saire⁷, Jean-Michel Mesnard^{1,2,  }, Jean-Marie
P  lopon  se^{1,2,  }

1- Universit   Montpellier, Centre d'  tudes d'agents Pathog  nes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS)

2- CNRS, FRE3689, CPBS, F-34293 Montpellier, France

3-Belgium Molecular and Cellular Epigenetics, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA) of University of Li  ge (ULg), Liège - Belgium

4- Brody School of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, East Carolina University, Greenville, NC, USA

5-Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule , CNRS - UCBL UMR 5239 , INSERM U 1210 UMS 3444 SFR Biosciences Lyon-Gerland, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69364 Lyon cedex 07, France.

6-Université du Québec    Montréal, Département des sciences biologiques, and Centre de recherche BioMed, Montréal (Québec) Canada, H2X 3X8

7-Laboratoire de Virologie-Immunologie JE2503, Centre Hospitalier et Universitaire de Martinique, Fort de France Martinique

   J.M.M. and J.M.P. are both corresponding authors

To whom correspondence is to be sent:

Dr Jean-Marie Péloponèse, CNRS, UMR5236, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France; e-mail: jean-marie.peloponese@cpbs.cnrs.fr

Dr Jean-Michel Mesnard, CNRS, UMR5236, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France; e-mail: jean-michel.mesnard@cpbs.cnrs.fr

Abstract

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) is a key player in proliferation and transformation of HTLV-1-infected cells, thus contributing to ATL development. HBZ deregulates gene expression within the host cell by interacting with several cellular partners. Through its C-terminal ZIP domain, HBZ is able to contact and activate JunD, a transcription factor of the AP-1 family. *jund* mRNA is intronless but can generate two protein isoforms by alternative translation initiation: JunD full-length and Δ JunD, an N-terminal truncated form unresponsive to the tumor suppressor menin. Using various cell lines and primary T lymphocytes, we show that after serum deprivation HBZ induces the expression of Δ JunD isoform. We demonstrate that, unlike JunD, Δ JunD induces proliferation and transformation of cells. In order to decipher the mechanisms for Δ JunD production, we looked into the translational machinery and observed that HBZ induces nuclear retention of *RPS25* mRNA and loss of RPS25 protein expression, a component of the small ribosomal subunit. Therefore HBZ bypasses translational control of JunD uORF and thus favors the expression of Δ JunD. In conclusion, we provide strong evidences that HBZ induces Δ JunD expression through alteration of the cellular translational machinery and that the truncated isoform Δ JunD plays a central role in the oncogenic process leading to ATL.

Keywords: AP-1, JunD, translation, leaky scanning, RPS25, HBZ

Introduction

Adult T-cell leukemia (ATL) is an aggressive and often fatal malignancy of mature activated CD4⁺ T lymphocytes associated with a complex retrovirus, human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)^{1,2}. The diversity in clinical features has led to a classification into four clinical forms of ATL: smouldering, chronic, acute, and lymphoma-type³. The pathological effects of the most aggressive forms, acute and lymphoma type, include multiple visceral lesions, mainly with infiltration of various organs including skin, spleen, liver and lungs. About 4% of HTLV-1-infected individuals develop ATL, with disease onset usually occurring after a prolonged latency period of up to 30-50 years post-infection. T-cell survival and proliferation (polyclonal expansion) in carriers are promoted by viral infection, which explains how HTLV-1-infected T cells are able to persist in the T-cell population for such a long period of time⁴.

Polyclonal proliferation of HTLV-1-infected T cells is induced by expression of the viral Tax protein⁵⁻⁷. However, Tax is the target of a strong anti-Tax immune response^{8,9} resulting in the removal of infected cell with high levels of Tax expression¹⁰. Moreover, in ATL cells, the occurrence of 5' long terminal repeat (LTR) methylation or its deletion is frequent, thereby leading to the inhibition of Tax expression^{11,12}. However, survival and proliferation of Tax-negative cells is supported by *HTLV-1 bZip factor (hbx)* gene expression^{11,13,14}, which is controlled by the 3' LTR¹⁵⁻¹⁷. Interestingly, as opposed to the 5' LTR, the 3' LTR is hypomethylated in ATL cells having a complete provirus¹⁸. Taken together, these observations explain why *hbx* expression is consistently detected in ATL cells¹¹.

Hbz encodes a 31-kDa protein that resembles a prototypical basic-leucine zipper (bZIP) factor^{19,20}, with an N-terminal transcriptional activation domain²¹, a central domain involved in nuclear localization²², and a C-terminal bZIP domain. The latter mediates interactions with several cellular transcription factors containing a bZIP domain, including CREB²³, ATF-1, -2, -3, and -4^{19,23-25}, C/EBP α and γ ^{25,26}, MafB²⁷, c-Jun, JunB, and JunD²⁸⁻³¹. The overall effect

of these interactions is to prevent the cellular factors from associating with their DNA-binding sites^{19,20,23,26,27}. However, HBZ has been reported to enhance the transcriptional activation function of JunD^{30,32}. By interacting with JunD, HBZ form a complex with stronger accessibility to transcriptional factors or cofactors bound to cellular promoters²⁰. Hence, HBZ-JunD heterodimer is then able to cooperate with the Sp1 transcriptional factor to enhance transcription through Sp1-binding sites^{15,32}.

JunD is an intriguing member of the AP-1 transcription factor complex behaving differently from c-Jun and JunB³³. While c-Jun is capable of transforming rodent fibroblasts in cooperation with Ras, JunD expression antagonizes Ras-mediated transformation³⁴. Interestingly, AP-1 complexes characterized in ATL cells contain JunD but not c-Jun and JunB³⁵, suggesting that JunD could be involved in the development of ATL³⁶, although mechanism mediating this effect remains unclear. Here, we confirm that there is a direct correlation between *hbz* gene expression and the increase of *junD* in CD8⁺-depleted PBMCs from ATL patients. We also demonstrate that during metabolic stress induced by growth factors and serum depletion, HBZ maintains cell survival and proliferation by promoting the production of a short isoform of JunD called ΔJunD. Furthermore, we showed that at the opposite of JunD alone, ΔjunD is promoting cell proliferation and cell transformation in murine and simian cells. We also demonstrated that HBZ affects the expression of ΔJunD by retaining the mRNA of RPS25, a component of the 40s ribosome subunit into the nucleus. Collectively, these new findings indicate that HBZ acts as a molecular switch to regulate JunD growth properties through protein translation changes.

Materials/Subjects and Methods

Subjects

Blood samples from HTLV-1 infected patients and non-infected donors were obtained from the CHU of Fort-de-France in Martinique. Patients suffering from ATL or HTLV-1 AC were recruited according to World Health Organization (WHO) criteria. According to the French Bioethics laws, the collection of samples from ATL, AC has been declared to the French Ministry of Research and the study was reviewed and approved by the CPP Sud-Ouest/Outre-Mer III, as well as the ARH from Martinique. Because the protocol is non-interventional (e.g. blood samples collected for routine health care with no additional samplings or specific procedures for subjects), no informed consent was provided by the patient, as stated by the French Public Health code and therefore the study was conducted anonymously. Clinical collection of samples for research purpose are stored at the Center of Biological Resources of Martinique (CeRBiM). The CeRBiM database has been approved by the CNIL. AC had no neurologic or hematological symptoms.

Cell Culture, Transfection and Treatments.

HTLV-I negative Jurkat (ATCC® TIB-152™) and HTLV-I-positive HUT-102 (ATCC® TIB-162™), C81-66 human T-cell lines, were propagated in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS) and transfected by electroporation. Vero cells (ATCC® CCL-81™), HEK293T cells (ATCC® CRL-3216™) were propagated in DMEM with 10% FCS and transfected according to manufacturer's protocol using Jet Pei (Polyplus Transfection, Illkirch, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats, CD4⁺ T cells were isolated from CD14⁻ peripheral blood lymphocytes with a CD4⁺ T-cell enrichment kit (Stem Cell Technologies) and CD8⁺-depleted PBMCs from HTLV-1 infected patients were isolated as previously described in Belrose et al.³⁷. CD8⁺-depleted PBMC and purified CD4⁺ were cultured

at 10^6 /ml in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) (Eurobio, Paris, France).

Luciferase Assay

Luciferase assays were performed as previously described¹⁵. Briefly, 293T cells were transfected with a plasmid DNA mixture containing 50 ng of indicated reporter plasmids and 50 ng of pCMV-FLuc. 36h post-transfection, cells were serum starved overnight, washed with cold PBS and then lysed in 1x passive lysis buffer (Promega, Charbonnieres, France). Luciferase assays were performed in a Centro XS3 LB 960 microplate luminometer (Berthold, Thoiry, France) with respectively the Genofax A, and Genofax C kit (Yelen, Ensue la Redonne, France) as described by the manufacturer. Luciferase activities were normalized for transfection efficiency based on Firefly luciferase readings.

Subcellular fractionation, RNA isolation and qRT-PCR analysis

Total RNA was prepared from whole cells using Trizol (Invitrogen) as previously described³⁷. For Nuclear and cytoplasmic compartments cells were lysed in RLN buffer (Qiagen). The lysate was spun at 3,200 rpm for 10 min at 4C to pellet the nuclei. The supernate (cytoplasm) was removed from the nuclear pellet. RLT buffer (Qiagen) was added to the washed nuclear pellet and the sample was homogenized by passing it through an 18½ gauge needle. 6 volumes of Qiazol (Qiagen) solution were added to the nuclear slurry and RNA was isolated according to the manufacturer's directions. Similarly, 7 volumes of Qiazol (Qiagen) were added to the cytoplasmic fraction and RNA was isolated according to the manufacturer's directions. After reverse transcription (RT) using oligo-dT 12-18 primer (Invitrogen), the abundance of transcripts was assessed by real-time, quantitative qPCR analysis using the SYBR green PCR master mix (Roche Diagnostics) and gene-specific primer sets. Standard curves were generated

from each PCR plate for all primer pairs using a serial dilution of an appropriate experimental sample. Samples were amplified in triplicate on each plate. Data were analyzed using LightCycler®480 Software (Roche Diagnostics). Primer for JunB, cJun, JunD, cFos, Fra-1, Fra-2, RPS genes, RPL19, HBZ, Tax, and HPRT-1 (housekeeping gene) were bought from Biorad.

Cell proliferation Assay.

Cell proliferation was determined using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo) according to manufacturer's protocol. Briefly, 10^3 Vero cells expressing Δ JunD, were plated in 96-well plates. 10 μ L WST-8 solution (Dojindo) were added daily to each well and incubated for 4 hours. The cell viability in each well was determined by reading the OD at 450 nm using a TECAN Infinite 200 Pro operated by the Magellan software (TECAN).

Anchorage-independent growth (soft agar cell culture) in 96-well plates.

Soft Agar in 96-well plates were performed according to Ke et al. ³⁸. Briefly, a mixture of 25 μ L prewarmed (37°C) 2 \times DMEM without phenol red containing 20% FBS, 4 mM L-Glu, 2 \times NEAA, 0.6% sodium bicarbonate, 2% sodium pyruvate, 200 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 25 μ L prewarmed (42°C) 1.2% Bacto™ Agar Select (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were plated onto each well of a 96-well microplate to serve as a prelayer for the assay. Ten microliters of cell suspensions containing 5×10^3 cells were mixed with 40 μ L 2 \times DMEM and 10 μ L 1.2% Bacto Agar Select in a 96-well round-bottom polypropylene microplate and transferred to the 96-well microplate containing the solidified prelayers. The cells were allowed to grow in the humidified 37°C incubator with 5% CO₂ for 1–2 weeks before cell proliferation and viability were scored using the recommended PerstoBlue assay methods (Invitrogen -A13261). Colony growth and cell viability was measured using a TECAN Infinite

200 Pro operated by the Magellan software (TECAN) with excitation at 570 nm and emission at 600 nm. Colony size were quantified using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>)³⁹.

Western blot analysis

36h post-transfection, cells were serum starved overnight, washed with cold PBS and then whole-cell lysates were prepared using RIPA buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS and 1 mM DTT], separated by electrophoresis on SDS-PAGE gels, and transferred onto PVDF membranes (Millipore). Incubations with primary antibodies to detect Tax (NIH reagent), HBZ (Eurogentec), JunD (Santa Cruz Biotech), Ribosomal proteins RPS 2,3,6,9,11,14,25,27A or RPL 7,12,15,23a and 26 (Bethyl Laboratory), β -actin (Sigma-Aldrich), Nucleoline C23 (Santa Cruz Biotech), Flag (Sigma-Aldrich) or Myc (Sigma-Aldrich) were followed by incubations with the appropriate secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (GE Healthcare) and by detection using enhanced luminescence (Roche). Protein bands were quantified following scanning by ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>)³⁹.

Plasmids.

pCMV-JunD- Δ 2ATG-Flag was generated by oligonucleotide-directed mutagenesis with point mutation of the AUG in ORF2 without affecting the ORF1. Lentiviral expression vectors for HBZ was generated by PCR using pcDNA 3.1-HBZ Myc as a template. The PCR product was subcloned into pOZ-Flag lentiviral vector⁴⁰. pOZ-gag-pol and pOZ-env were described elsewhere⁴¹. MISSION® pLKO.1-puro shRNA plasmids were purchased from Sigma-Adrich.

Statistical analysis

(1) Pearson's correlation for two-dimensional hierarchical clustering analysis; (2) two-tailed paired Student's t test or 2-way ANOVA for in vitro cell lines and primary cells experiments, including luciferase assay, RT-PCR, CHIP assay, cell growth assay. Data are presented as mean \pm SD. Differences were considered significant at **P<0.01, and ***P<0.001.

Results

HBZ stimulates Δ JunD expression

JunD is often reported to function as a negative regulator of cell proliferation³⁴. However, we recently demonstrated that stable expression of the viral protein HBZ in murine fibroblasts stimulates JunD expression as well as certain properties associated with cellular transformation¹⁵. To investigate the role of JunD in HTLV-1-induced cellular proliferation and transformation, we first compared the kinetics of mRNA synthesis for several members of the Jun and Fos families in cultured primary CD8⁺-depleted PBMCs freshly isolated from asymptomatic carriers (ACs) or ATL patients (Fig. 1). Similar to our previous observation in HAM/TSP cells³⁷, *hbz* expression in ATL cells increased over time with maximum *hbz* expression observed after 5 days of culture (Fig. 1A). During this timeframe *tax* expression was not detected (Fig. 1B). Similar to the pattern of *hbz* mRNA, *JunD* mRNA levels also increased (Fig. 1E), and the levels of *JunD* mRNA correlated with those of *hbz* mRNA ($R=0,998$, $p=0,006$) (Fig. 1I). In contrast, no significant correlation was observed between *hbz* expression and the expression of other AP-1 factors.

We then examined JunD protein levels in two human T-cell lines infected with HTLV-1 and one uninfected T-cell line. The HTLV-1-infected cell lines analyzed were chosen according to the observed inverse correlation between virus production and HBZ expression^{42,43}. HUT-102 cells possess high levels of Gag and Tax⁴⁴ but very low HBZ level⁴⁵ (Fig. 2A, lane 2), and C81-66 cells do not produce viral structural proteins⁴⁴ but contain a high level of HBZ (Fig. 2A, lane 3). While the full-length, 39-kDa isoform of JunD (JunD-FL) was observed in each of the cell lines tested, the 34-kDa isoform of JunD (Δ JunD) was only detected in C81-66 cells (Fig. 2A, lanes 3). Although Tax has been reported to induce JunD expression⁴⁶, high HBZ rather than high Tax expression appeared to be aligned with the expression of the Δ JunD isoform.

To determine whether HBZ induces Δ JunD expression, we first transfected HEK293T cells with a constant amount of a JunD expression vector and increasing quantities of an HBZ expression vector and found that JunD levels increased proportionally with the levels of HBZ (Fig 2B, lanes 2-4). To verify that Δ JunD production was not a byproduct of elevated JunD-FL synthesis, we transfected cells with increasing quantities of the JunD expression vector alone and found that, while the level of JunD-FL increased, Δ JunD expression did not occur (Fig. 2C). We next analyzed the effect of HBZ on Δ JunD production in primary CD4⁺ T cells isolated from PBMC, using a transduction-competent retrovirus for HBZ expression. We found that both cells expressing HBZ or transduced with the empty construct expressed JunD-FL, but only cells with HBZ produced Δ JunD (Fig. 2D). Finally, we tested whether reduced HBZ expression in C8166 cells affected the level of Δ JunD. Using a retroviral shRNA transduction system, we found that cells expressing the scrambled *hbz* target sequence or transduced with the empty vector displayed similar levels of HBZ and Δ JunD (Fig. 2E, lanes 1 and 2). However, in cells expressing the correct shRNA target sequence for *hbz*, expression of the viral protein was lost as was Δ JunD expression (Fig. 2E, lanes 3). Altogether, our results demonstrate that HBZ is involved in the production of Δ JunD.

Δ JunD induces cell proliferation and transformation

As JunD has been described to shift from a growth suppressor to a growth promoter when deprived of menin⁴⁷, we next asked whether expression of Δ JunD, which lacks forty-six amino acids of the menin interaction domain, alters proliferation of immortalized cells. To answer this question, we stably transfected Vero cells with expression vectors for Δ JunD and different forms of the *hbz* gene either alone or in combination. The HBZ expression vectors tested included the expression vector for wild type HBZ (HBZ WT), an expression vector for wild type HBZ containing silent mutations that disrupt the secondary structure of the mRNA (HBZ

SM)¹¹, and an *hbz* gene vector containing mutations in the ATG start codons that prevent production of HBZ protein (HBZ Δ 2ATG)¹⁵. We found that cells expressing HBZ WT or HBZ SM produced a similar level of HBZ (data not shown). To monitor proliferation, cells were plated at a low concentration in low-serum medium (1% FCS) and analyzed daily for five days. Overall, we found that, like each of the HBZ variants, Δ JunD stimulated cell proliferation; however, under these conditions there was not an additive effect on proliferation in cells co-expressing Δ JunD with any of the HBZ variants (Fig. 3A).

To assess possible effects of Δ JunD on anchorage-independent growth, which is another event that defines transforming activity in immortalized fibroblasts⁴⁸, we analyzed the Vero cells stably expressing Δ JunD and/or the HBZ variants using a 96 well plate soft agar assay in which we monitored foci formation over a two week period. Consistent with our previous results¹⁵, foci formed from cells expressing HBZ WT, but failed to form from cells carrying the empty vector (Fig. 3B and C). Foci also formed from cells expressing HBZ SM and, interesting, from cells expressing Δ JunD, but did not form from cells expressing HBZ Δ 2ATG (Fig. 3B and C). Cells co-expressing Δ JunD and either HBZ WT or HBZ SM exhibited an enhanced capacity for focal formation (Fig. 3B, C and D). These results show that, similar to HBZ, Δ JunD exhibits certain transforming properties.

HBZ mediates leaky scanning across the first initiation codon of *JunD*

The fact that Δ JunD is produced through alternative translation initiation utilizing a downstream AUG in the *JunD* mRNA suggested that HBZ regulates Δ JunD expression at the level of translation. Indeed, multiple AUG codons in select mRNAs have been found to modulate translation through a mechanism in which the ribosomal initiation complex recognizes an upstream AUG (uAUG), causing interference with the ability of the complex to scan to a downstream start codon⁴⁹. To test whether HBZ affects this process, we used the *Photinus*

luciferase reporter constructs previously used by Mauro et al. to study ribosome shunting and leaky scanning⁵⁰. The p3+uAUG vector contains a small ORF that overlaps and is out-of-frame with the luciferase gene, while p3-uAUG reference plasmid lacks the uAUG (Fig. 4A). In transfected HEK293T cells, luciferase activity from p3+uAUG was 75% lower than that from p3-uAUG; however, co-transfection of the HBZ expression vector with p3+uAUG led to a dose-dependent increase in luciferase activity (Fig. 4B). Using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we confirmed that this effect was not due to stimulation of *Photinus* luciferase mRNA synthesis by HBZ (Fig. 4C). These data indicate that HBZ enhances the ability of the ribosomal initiation complex to bypass translational control exerted by a uORF, allowing for translation initiation at downstream AUG start codons.

Interestingly, the *JunD* mRNA contains a third AUG codon in the context of a consensus Kozak sequence (AUG2) that is found between, but out-of-frame with, the JunD-FL and ΔJunD AUG start codons and is part of a hypothetical open reading frame (ORF) for a five amino acid peptide (Fig. 4D). To test whether this element affected ΔJunD translation, we constructed a JunD-ΔAUG2 mutant vector that contained a silent mutation in AUG2. As expected, in transfected HEK293T cells, both the wild type and the JunD-ΔAUG2 vectors only produced ΔJunD in the presence of HBZ (Fig. 4E). Interestingly when HBZ was present, the ratio between ΔJunD and JunD-FL was higher with the JunD-ΔAUG2 mutant than with the WT construct (Fig. 4F). This result shows that the AUG2 element negatively impacts ΔJunD synthesis.

HBZ inhibits RPS25 expression through retention of *RPS25* mRNA in the nucleus

The ability of HBZ to abrogate uORF translational control indicated that the viral protein promoted ribosomal dysfunction, which is linked to an increased predisposition to cancer and has been found to arise, in part, through the differential expression of ribosomal proteins^{51,52}. Among the ribosomal proteins, we focused on determining whether HBZ affected expression

of RPS25 due to its potentially important role in cancer development and in response to pathological stimuli^{53,54}. Using qRT-PCR, we compared *RPS25* expression between CD8⁺-depleted PBMCs from ACs and ATL patients (Fig. 5A), and among uninfected Jurkat cells and HTLV-1-infected HUT-102 and C81-66 cells (Fig 5B). Interestingly, we observed higher levels of *RPS25* mRNA in cells expressing HBZ (i.e. ATL and C81-66). Next, we assessed the mRNA levels of 15 RPS genes including *RPS25* in HEK293T cells stably expressing HBZ and found that the presence of HBZ was associated with significantly increased *RPS25* mRNA abundance ($p=0,0005$) (Fig 5C). In addition, the mRNA levels of two other RPS genes (*RPS4X* and *RSP27A*) were also significantly altered in the presence of HBZ (*RPS4x* $p= 0,0027$; *RPS27A* $p < 0,0001$).

We then examined whether HBZ also affected RPS25 protein expression by first comparing RPS25 levels in Jurkat, HUT-102 and C81-66 cells cultured with normal or low serum concentrations. The latter variation was included based on observations that nutrient deprivation suppresses RPS25 protein expression through a mechanism involving nuclear retention of its mRNA^{53,55}. We found that Jurkat cells exhibited a reduction in RPS25 when serum-starved, while the HTLV-1-infected cells displayed relatively constant levels of RPS25 under both culture conditions (Fig 6A). Interestingly, the level of RPS25 was substantially lower in C8166 cells despite their high level of *RPS25* mRNA (Fig 6A, lanes 5 & 6). The higher HBZ expression in this infected cell line suggested that HBZ was involved in RPS25 down-regulation. To test this hypothesis, we analyzed the levels of eight ribosomal proteins of the 40S subunit (RPS2, RPS3, RPL6, RPS9, RPS11, RPS14, RPS25, RPS27A) in HEK293T cells stably expressing HBZ and the parental cells. Among this panel, only RPS25 and RPS27A levels were reduced in the presence of HBZ (Fig. 6B). Next, we examined the protein levels of HBZ, RPS25 and JunD in *ex vivo* cultured CD8⁺-depleted PBMCs isolated from an ATL

patient. Concomitant with the induction of HBZ and Δ JunD expression, we observed a decrease in RPS25 (Fig 6C). Together, these results indicate that HBZ reduces RPS25 protein levels.

The inverse effect of HBZ on the levels of *RPS25* mRNA and protein is analogous to events that occur during cellular stress, such as through amino acid starvation, during which time *RPS25* mRNA increases in abundance but is retained in the nucleus^{53,55}. Therefore it was possible that HBZ promoted the nuclear retention of *RPS25* mRNA. To test this hypothesis, we compared the mRNA levels of *RPS25* and *RPL19* in nuclear and cytoplasmic fractions. A comparison of the Jurkat and two HTLV-1-infected cell lines revealed significant nuclear enrichment of *RPS25* mRNA only in C8166 cells; *RPL19* mRNA did not exhibit any significant variation among the three cell lines (Fig. 6D). Furthermore, *RPS25* mRNA showed significantly nuclear enrichment in HEK293T cells stably expressing HBZ compared to the parental cells, while the pattern of *RPL19* mRNA was similar between cell lines (Fig. 6E). Our results suggest that HBZ decrease RPS25 protein abundance by retaining its mRNA in the nucleus.

Inhibition of RPS25 expression stimulates Δ JunD synthesis

To determine whether the reduction in RPS25 by HBZ is involved in the translational regulation of Δ JunD expression, we first tested whether RPS25 affected uORF translational control. To manipulate RPS25 expression, three shRNA vectors were constructed, and each was found to substantially reduce RPS25 expression in transfected HEK293T cells (Fig. 7A). We then cotransfected HEK293T cells with the pLKO shRNA control or pLKO-puro-shRPS25 vectors and p3-uAUG or p3+uAUG. As expected, in HEK 293T cells, knock-down of RPS25 did not affect luciferase activity from p3-uAUG, and p3+uAUG exhibited reduced luciferase activity when cotransfected with the empty shRNA vector (Fig. 7B). However, interestingly, knockdown of RPS25 was able to efficiently restore luciferase activity from p3+uAUG (Fig. 7B). This effect was not due to an increase in the relative level of *Photinus* luciferase mRNA

(Fig. 7C). Finally, we tested whether knockdown of RPS25 was sufficient for induction Δ JunD expression. Consistent with previous experiments, HEK293T cells transfected with the JunD expression vector failed to produce significant quantities of Δ JunD; however, Δ JunD expression was apparent in cells lacking RPS25 (Fig. 7D). These results link the ability of HBZ to reduce RPS25 expression with its ability to induce Δ JunD expression.

Discussion

While members of the Jun family of proteins share extensive homology within their C-terminal bZIP domains, their N-terminal regions diverge in amino acid sequence and primarily account for functional differences among family members. JunD carries a 95 amino acid N-terminal region, within which amino acids 1-44 constitute an interaction domain for menin that is absent from other Jun family members³³. Menin is known to function as a tumor suppressor by supporting transcriptional repression⁵⁶. Consequently, when bound to menin and in stark contrast to other Jun family members, JunD has been shown to repress transcription and function as a growth suppressor⁵⁷. Despite the defined role of the JunD/menin complex, ATL cells express high levels of both proteins while exhibiting a transformed phenotype. It has been suggested that subversion of growth suppression by the JunD/menin complex in these cells is elicited by binding of HBZ to JunD, which transforms JunD into a transcriptional activator⁵⁸. In the current study, we have uncovered an additional mechanism used by HBZ to modulate JunD activity that involves the ability of HBZ to stimulate expression of the truncated isoform of JunD, Δ JunD which lacks the menin binding domain. Using an immortalized fibroblast model, we found that Δ JunD exhibits growth promoting and transforming-like effects that are augmented by HBZ. These observations are consistent with previous data showing that disruption of the JunD-menin complex, either through loss of menin or by disabling the ability of menin to bind JunD, confers JunD with growth-promoting capabilities⁴⁷.

The *jund* gene lacks introns and produces the 34-kDa Δ JunD and 39-kDa full-length (JunD-FL) isoforms through alternate, in-frame translation start sites³³. Our results show that the upstream AUG that controls translation of JunD-FL (the uORF) is responsible for repressing translation of Δ JunD, as it is a second out-of-frame, upstream AUG that is not known to produce a functionally relevant protein. These results contrast with those from a previous study showing that JunD-FL and Δ JunD were present at near equivalent levels and that mutation of the JunD-

FL AUG start codon did not affect Δ JunD levels⁵⁷. This discrepancy may, in part, relate to the use of HeLa cells as a model in the former study. These cells express the HPV oncoproteins, E6 and E7, which have been shown to affect translation and may therefore regulate Δ JunD expression⁵⁹.

uORFs suppress translation of downstream ORFs⁴⁹. This regulatory mechanism appears to be relatively common, as uORFs are present in two-thirds of mRNAs encoding oncogenes and proteins that regulate important cellular processes, such as the cell cycle and response to stress⁴⁹. Indeed, recent studies have revealed that disruption of uORF-mediated translational control is strongly associated with the development of human disease or with disease susceptibility^{49,60}. Here we show that HBZ relieves uORF translational control, which is the mechanism responsible for Δ JunD expression in ATL cells and adds to accumulating evidence implicating HBZ in the development and maintenance of ATL⁶¹. While we found that the functions of Δ JunD are consistent with cellular transformation, it is possible that the general effect of HBZ on uORF regulation may stimulate the translation of other ORFs that also contribute to the ATL phenotype. This is an hypothesis that should be explored in future studies.

There are three known mechanisms that could account for translation of Δ JunD and the positive effect of HBZ on this process. First, Δ JunD translation may occur through an internal ribosomal entry site (IRES). In lieu of this possibility, Short & Pfaar have presented strong evidence that the 5'UTR of the *JUND* mRNA does not contain a conventional IRES that might promote Δ JunD expression⁵⁷. Second, non-linear scanning (ribosomal shunting) could allow the ribosome to bypass the uORFs in the *JUND* mRNA in order to initiate translation of Δ JunD. This mechanism would lead to a reduced translation of JunD-FL from the uORF, which we found did not occur during HBZ-mediated Δ JunD expression. Furthermore and as discussed below, Δ JunD expression correlated with a reduction in abundance of the small, non-essential ribosomal protein, RPS25, which is known to facilitate ribosomal shunting⁶². The third possible

mechanism that could modulate Δ JunD expression involves leaky scanning, in which some ribosomes are able to transit the uORFs and initiate translation at the Δ JunD start codon. This mechanism would not necessarily cause a substantial reduction in uORF translation, which is consistent with most of our observations that HBZ did not substantially affect JunD-FL levels. Based on our results, we propose a novel model in which HBZ induces Δ JunD expression by causing a reduction in the cellular abundance of RPS25. This model is supported by our observation that shRNA-mediated knock-down of RPS25 was sufficient to induce Δ JunD translation. Interestingly, despite the fact that RPS25 has not previously been shown to play a role in translation occurring through a linear scanning process⁶², our results suggest that it does in fact contribute to the integrity of uORF regulation during linear scanning. Our data show that the decrease in RPS25 protein in the presence of HBZ is caused by retention of *RPS25* mRNA in the nucleus. Future studies will aim to clarify how HBZ modulates nuclear retention of *RPS25* mRNA, as this effect likely accounts for the ability of the viral protein to suppress uORF regulation and is required for Δ JunD expression.

In summary, we have identified a novel molecular mechanism that likely contributes to the transforming properties of the viral protein, HBZ. Our data also add to the accumulating evidence linking defects in uORF regulation with human disease. Further characterization of the mechanisms responsible for these defects will be of great value in the discovery of novel biomarkers and therapeutic targets for developing new strategies to control many diseases including malignancies as well as metabolic and neurologic pathologies.

Acknowledgments

We kindly thank Dr Mauro for the gift of p3(AUG)-Firefly Luc vectors, Dr Benkirane for the gift of pOZ lentiviral vectors. We would like to thank Dr Nicolas Polakowski for critical readings of manuscript. This work was supported by the ARC foundation and la Ligue Contre

le Cancer, Comité Hérault. H.G. was supported by a grant from the Conseil Régional de la Martinique.

Conflict of Interests

None of the authors have competing interests

References

1. Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2005;2:17.
2. Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*. 2005;2:16.
3. Shimoyama M. 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*. 1991;79:428-437.
4. Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia*. 2003;17:26-38.
5. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:270-280.
6. Mesnard JM, Devaux C. Multiple control levels of cell proliferation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Virology*. 1999;257:277-284.
7. Peloponese JM, Yeung ML, Jeang KT. Modulation of nuclear factor-kappaB by human T cell leukemia virus type 1 Tax protein: implications for oncogenesis and inflammation. *Immunol Res*. 2006;34:1-12.
8. Enose-Akahata Y, Abrams A, Johnson KR, Maloney EM, Jacobson S. Quantitative differences in HTLV-I antibody responses: classification and relative risk assessment for asymptomatic carriers and ATL and HAM/TSP patients from Jamaica. *Blood*. 2012;119(12):2829-2836.
9. Hanon E, Hall S, Taylor GP, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2000;95(4):1386-1392.
10. Kannian P, Yin H, Doueiri R, Lairmore MD, Fernandez S, Green PL. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J Virol*. 2012;86(7):3757-3766.
11. Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:720-725.
12. Takeda S, Maeda M, Morikawa S, et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*. 2004;20:559-567.
13. Arnold J, Yamamoto B, Li M, et al. Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood*. 2006;107:3976-3982.
14. Arnold J, Zimmerman B, Li M, Lairmore MD, Green PL. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood*. 2008;112:3788-3797.
15. Gazon H, Lemasson I, Polakowski N, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP factor requires cellular transcription factor JunD to upregulate HTLV-1 antisense transcription from the 3' long terminal repeat. *J Virol*. 2012;86(17):9070-9078.
16. Landry S, Halin M, Vargas A, Lemasson I, Mesnard JM, Barbeau B. Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J Virol*. 2009;83:2048-2054.
17. Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J, Fujisawa J-I, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced HTLV-1 bZIP factor gene. *J Virol*. 2008;82:9359-9368.
18. Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, et al. 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type I provirus in vitro and in vivo. *J Virol*. 2002;76:9389-9397.

19. Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The complementary strand of HTLV-1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates the viral transcription. *J Virol.* 2002;76:12813-12822.
20. Hivin P, Arpin-André C, Clerc I, Barbeau B, Mesnard JM. A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:2761-2772.
21. Clerc I, Polakowski N, Andre-Arpin C, et al. 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.* 2008;283:23903-23913.
22. Hivin P, Frédéric M, Arpin-André C, et al. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Science.* 2005;118:1355-1362.
23. Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, et al. 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.* 2007;81:1543-1553.
24. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZIP factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology.* 2011;8.
25. Reinke AW, Grigoryan G, Keating AE. Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays. *Biochemistry.* 2010;49:1985-1997.
26. Zhao T, Coutts A, Xu L, Yu J, Ohshima K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBPalpha signaling. *Retrovirology.* 2013;10:159.
27. Ohshima T, Mukai R, Nakahara N, et al. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *J Cell Biochem.* 2010;111:187-194.
28. Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. HBZ factor of HTLV-I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2003;278:43620-43627.
29. Hivin P, Basbous J, Raymond F, et al. The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology.* 2007;4:14.
30. Thébault S, Basbous J, Hivin P, Devaux C, Mesnard JM. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS lett.* 2004;562:165-170.
31. Matsumoto J, Ohshima T, Isono O, Shimotohno K. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene.* 2005;24:1001-1010.
32. Kuhlmann AS, Villaudy J, Gazzolo L, Castellazzi M, Mesnard JM, Duc Dodon M. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology.* 2007;4:92.
33. Hernandez JM, Floyd DH, Weilbaecher KN, Green PL, Boris-Lawrie K. Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene.* 2008;27(35):4757-4767.
34. Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell.* 1994;76(4):747-760.
35. Mori N, Fujii M, Iwai K, et al. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2000;95:3915-3921.

36. Barbeau B, Mesnard JM. Does the HBZ gene represent a new potential target for the treatment of adult T-cell leukemia? *Int Rev Immunol*. 2007;26:283-304.
37. Belrose G, Gross A, Olindo S, et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood*. 2011;118(9):2483-2491.
38. Ke N, Albers A, Claassen G, et al. One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques*. 2004;36(5):826-828, 830, 832-823.
39. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-675.
40. Nakatani Y, Ogryzko V. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol*. 2003;370:430-444.
41. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-657.
42. Barbeau B, Mesnard JM. Making Sense out of Antisense Transcription in Human T-Cell Lymphotropic Viruses (HTLVs). *Viruses*. 2011;3:456-468.
43. Belrose G, Gross A, Olindo S, et al. Opposite effects of valproate on Tax and HBZ expressions in T-lymphocytes from HTLV-1 asymptomatic carriers and HAM/TSP patients. *Blood*. 2011;118:2483-2491.
44. Shuh M, Hill SA, Derse D. Defective and wild-type human T-cell leukemia virus type I proviruses: characterization of gene products and trans-interactions between proviruses. *Virology*. 1999;262(2):442-451.
45. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology*. 2016;13:29.
46. Fujii M, Niki T, Mori T, et al. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene*. 1991;6:1023-1029.
47. Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, et al. Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10770-10775.
48. Risser R, Pollack R. A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells. *Virology*. 1974;59(2):477-489.
49. Wethmar K, Smink JJ, Leutz A. Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays*. 2010;32(10):885-893.
50. Mauro VP, Chappell SA, Dresios J. Analysis of ribosomal shunting during translation initiation in eukaryotic mRNAs. *Methods Enzymol*. 2007;429:323-354.
51. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):179-192.
52. Stumpf CR, Ruggero D. The cancerous translation apparatus. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(4):474-483.
53. Adilakshmi T, Laine RO. Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem*. 2002;277(6):4147-4151.
54. Zhang X, Wang W, Wang H, Wang MH, Xu W, Zhang R. Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop. *Oncogene*. 2013;32(22):2782-2791.
55. Laine RO, Shay NF, Kilberg MS. Nuclear retention of the induced mRNA following amino acid-dependent transcriptional regulation of mammalian ribosomal proteins L17 and S25. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9693-9697.
56. Kim H, Lee JE, Cho EJ, Liu JO, Youn HD. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res*. 2003;63:6135-6139.

57. Short JD, Pfarr CM. Translational regulation of the JunD messenger RNA. *J Biol Chem.* 2002;277(36):32697-32705.
58. Borowiak M, Kuhlmann AS, Girard S, et al. HTLV-1 bZIP factor impedes the menin tumor suppressor and upregulates JunD-mediated transcription of the hTERT gene. *Carcinogenesis.* 2013;34(11):2664-2672.
59. de Wilde J, De-Castro Arce J, Snijders PJ, Meijer CJ, Rosl F, Steenbergen RD. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cell Oncol.* 2008;30(1):77-87.
60. Barbosa C, Peixeiro I, Romao L. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003529.
61. Mesnard JM, Barbeau B, Cesaire R, Peloponese JM. Roles of HTLV-1 basic Zip Factor (HBZ) in Viral Chronicity and Leukemic Transformation. Potential New Therapeutic Approaches to Prevent and Treat HTLV-1-Related Diseases. *Viruses.* 2015;7(12):6490-6505.
62. Hertz MI, Landry DM, Willis AE, Luo G, Thompson SR. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol Cell Biol.* 2013;33(5):1016-1026.

Figures Legends

Figure 1: AP-1 transcription factors JunD and Fra-2 are highly expressed in fresh ATL cells. (A-B) Relative expression of *tax* and *hbx* was measured by quantitative RT-PCR and normalized to HPRT RNA levels in CD8⁺-cell-depleted PBMCs from AC and ATL cells. (C-H) Relative expression of six AP-1 transcription factor genes (*JunB*, *c-Jun*, *JunD*, *c-Fos*, *Fra-1* and *Fra-2*) was measured by quantitative RT-PCR and normalized to HPRT RNA levels in CD8⁺-cell-depleted PBMCs from HTLV-1 asymptomatic carriers (AC) and patients with acute ATL (ATL). Significant difference in relative expression is indicated by asterisks (* $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$). (I) Correlation between JunD increased expression and HBZ in *ex vivo* cultured cells from patients with acute ATL. Pearson's correlation coefficient was 0.9998 ($p = 0.006$).

Figure 2: HBZ induces the expression of a second isoform of JunD. (A) Western blot analysis of whole cell extracts prepared from a control T-cell line Jurkat (lane 1) and HTLV-1 infected T-cell lines HUT-102 (lane 2) and C81-66 (lane 3). Two dominant JunD-reactive bands were found, a 39-kDa full-length JunD isoform (JunD-FL) and a shorter 34-kDa isoform (Δ JunD) in C81-66 (lane 3). (B) 293T were co-transfected with JunD-Flag plasmid and increasing amounts of HBZ-Myc plasmid (lanes 2-4). Forty-eight hours after transfection, JunD, HBZ and nucleolin expression were assessed by western blot. Cells were starved of serum overnight before western blot analysis. (C) 293T were transfected with increasing amounts of JunD-Flag plasmid (lanes 2 and 3). Forty-eight hours after transfection, JunD and nucleolin expression were assessed by western blotting analysis. Cells were starved of serum overnight before western blot analysis. (D) Activated CD4⁺ T-lymphocytes were transduced with lentiviral particles expressing pOZ-HBZ-Flag. 96 hours after transduction, JunD, HBZ and nucleolin expression were assessed by western blotting analysis. Cells were starved of serum overnight before western blot analysis. (F) C81-66 cells were transfected with 8 μ g of an empty

shRNA vector (lane 1), a vector coding for a scrambled shRNA (lane 2) and a vector coding for a shRNA directed against HBZ (lane 3). Twenty-four hours after, transfected cells were selected during three days with 2 μ g/ml of puromycine and then JunD, Tax, HBZ and nucleolin expression were assessed by western blot.

Figure 3: Effect of Δ JunD on the proliferation and anchorage-independent growth. The non-tumorigenic simian cell line Vero was stably transfected with either HBZ WT, HBZ SM, HBZ Δ 2ATG in absence or presence of Δ JunD. (A) Effect of Δ JunD on cellular proliferation. Cell proliferation was monitored daily using CCK8-coloration assay (Dojindo). Effect of Δ JunD on Anchorage-independent growth was monitored using soft agar assay. (B) Micrographs showing the colonies formed in the agar matrix at day 14. (C) Absorbance-based quantitative analysis showing the differences of anchorage-independent growth in Vero-HBZ WT, Vero-HBZ SM, Vero-HBZ D2ATG in absence or presence of Δ JunD. All data were presented as the mean of three independent experiments \pm the standard deviation (SD). (D) Growth of Vero cells stably expressing HBZ and HBZ functional mutants +/- Δ JunD was quantified, by measuring colony area at 7 days (white histogram) or 14 days (grey histogram) after plating. Colony area were assessed using image J software. All data were presented as the mean of three independent experiments \pm the standard deviation (SD) and analyzed using unpaired t test (* p =0,01; ** p=0,001, ***p= 0,0001).

Figure 4: HBZ promotes leaky scanning across an upstream AUG upon serum deprivation. (A) Firefly luciferase reporter mRNAs are indicated schematically. The white arrow indicates the luciferase initiation codon (AUG). The black arrow indicates an uAUG, the resulting ORF overlaps the luciferase cistron in the same reading frame. (B) In the histogram, translation efficiencies of the Firefly Luciferase in HEK293T cells are expressed as percentage

of the control without uAUG, in the absence or presence of increasing amount of HBZ. Error bars indicate SEM. (C) Transcription efficiencies in HEK293T cells of the different constructs are measured by qRT-PCR in the absence or presence of increasing amount of HBZ. Error bars indicate SEM. Mutation of uORF start codon does affect translation of Δ JunD in presence of HBZ. (D) Schematic diagram of the uORF sequence. The JunD WT construct, was used to generate mutations within the uORF start codon. (E) Wild-type and mutated plasmids were transfected into HEK293T cells with or without HBZ, and equal amounts of whole cell extracts were analyzed for expression of Flag-tagged JunD isoforms by Western blotting and (F) ratio of Δ JunD/JunD was quantified using image J.

Figure 5: RPS25 mRNA is highly expressed in fresh ATL cells (A-B) Relative expression of RPS25 gene was measured by quantitative RT-PCR and normalized to HPRT RNA levels in (A) CD8⁺-cell-depleted PBMCs from HTLV-1 asymptomatic carriers (AC) and patients with acute ATL (ATL) and (B) in Jurkat and HTLV-1 infected T-cell lines HUT-102, C81-66. (C) Relative expression of 15 ribosomal genes was measured by quantitative RT-PCR and normalized to HPRT RNA levels in 293T and 293T stably expressing HBZ (293T-HBZ). Significant difference in relative expression is indicated by asterisk (*p<0.01; *** p<0.0001).

Figure 6: HBZ represses RPS25 expression by retaining its mRNA in the nucleus. (A) Western analysis of RPS25 expression in whole cell extract prepared from control T-cell line Jurkat (lane 1) and HTLV-1 infected T-cell lines HUT-102 (lane 2), C81-66 (lane 3) with or without serum starvation. (B) Western blot analysis of 8 ribosomal proteins from the 40s subunit in HBZ-expressing cells. Total lysates from 293T and 293T-HBZ were analysed by Western blotting and expression of RPS25 was compared to expression of 7 others ribosomal proteins. (C) RPS25 expression was analysed in total lysate from CD8⁺-depleted-PBMC

isolated from an acute ATL patient and cultured *ex vivo* for 5 days. (D-E) HBZ induces nuclear retention of RPS25 mRNA. Relative expression of RPS25 gene was measured by quantitative RT-PCR and normalized to HPRT RNA levels after cellular fractionation in (D) HTLV-1 infected T-cell lines HUT-102 and C81-66 and (E) 293T cells stably-expressing HBZ

Figure 7: Depletion of RPS25 protein induces expression of Δ JunD. (A) 293T cells were transfected with a control plasmid (pcDNA) (lane 1), pLKO-control plasmid (lane 2) or pLKO-shRNA against RPS25 (lanes 3-6). Seventy-two hours after transfection RPS25 and actin expression were assessed by western blot. (B) Translation efficiencies of the Firefly Luciferase in HEK293T cells are expressed as percentage of the control without uAUG, in the absence or presence of RPS25. Error bars indicate SEM. (C) Transcription efficiencies in HEK293T cells of the different constructs are measured by qRT-PCR in the absence or presence of RPS25. Error bars indicate SEM. (D) 293T cells were co-transfected with a control plasmid (pcDNA) (lanes 1 and 3), with JunD-Flag (lanes 2 and 4) and shRNA mix against RPS25 (lanes 3-4) or shRNA control (lanes 1-2). Seventy-two hours after transfection JunD, RPS25 and actin expression were assessed by western blot.

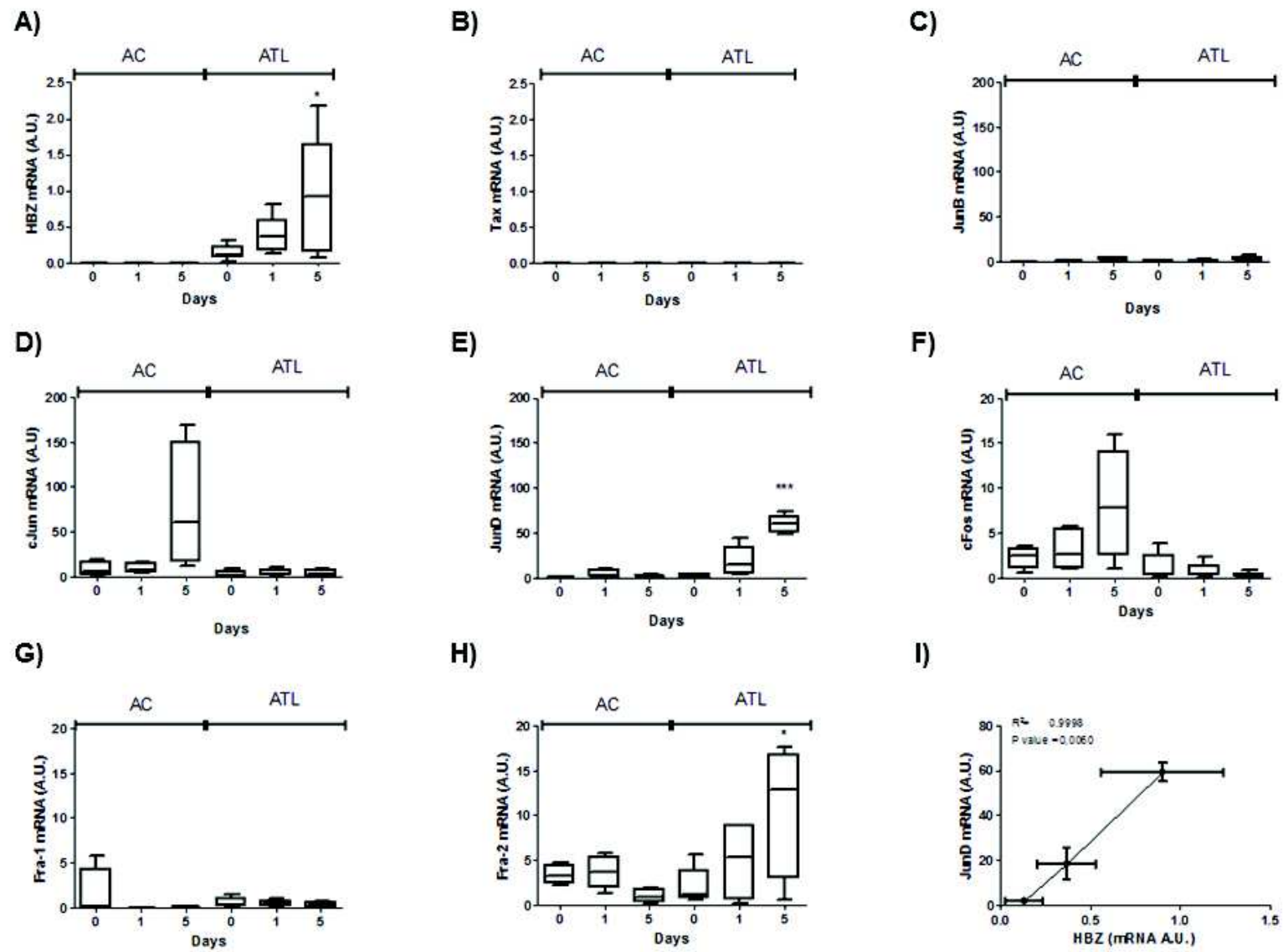


Figure1

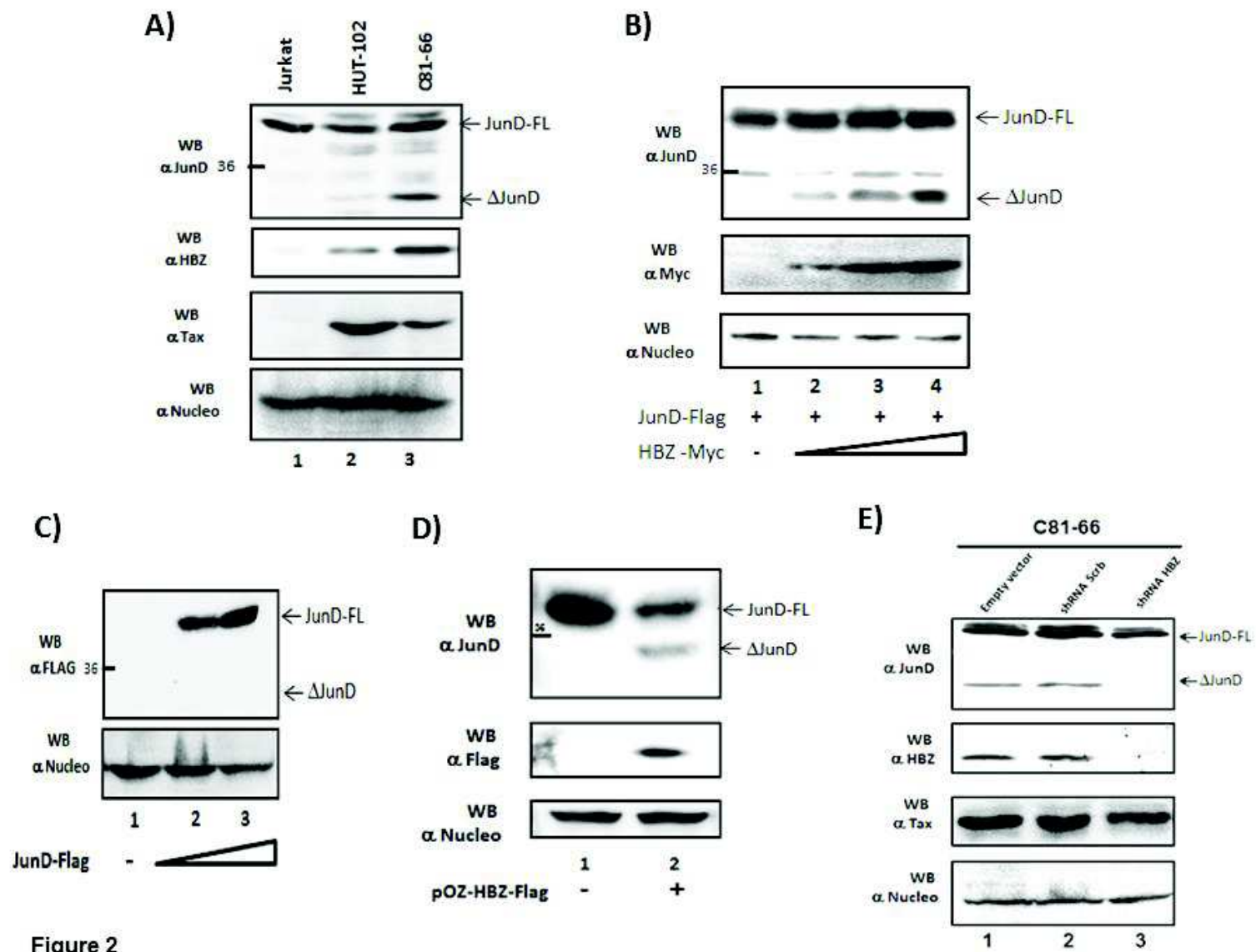


Figure 2

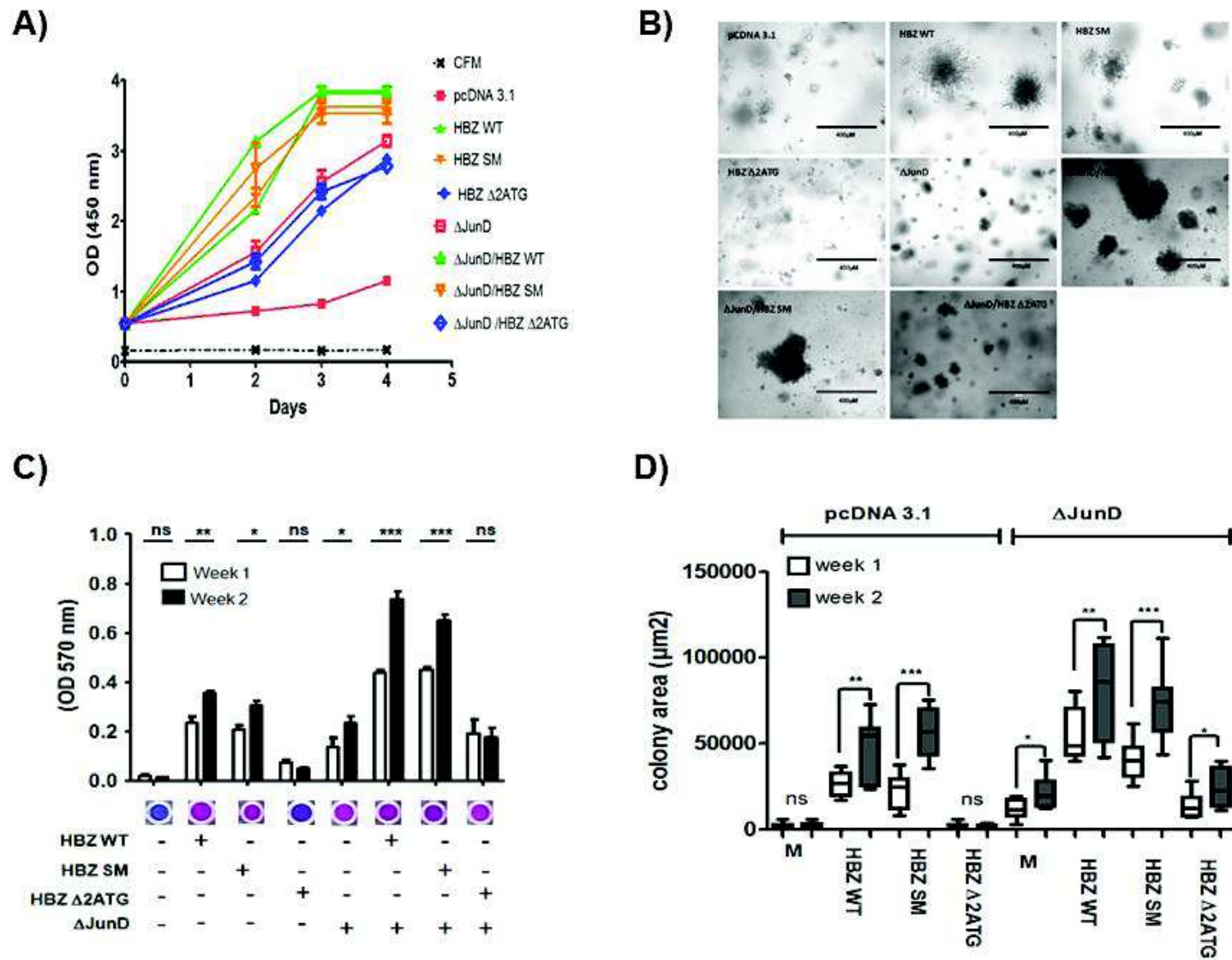


Figure 3

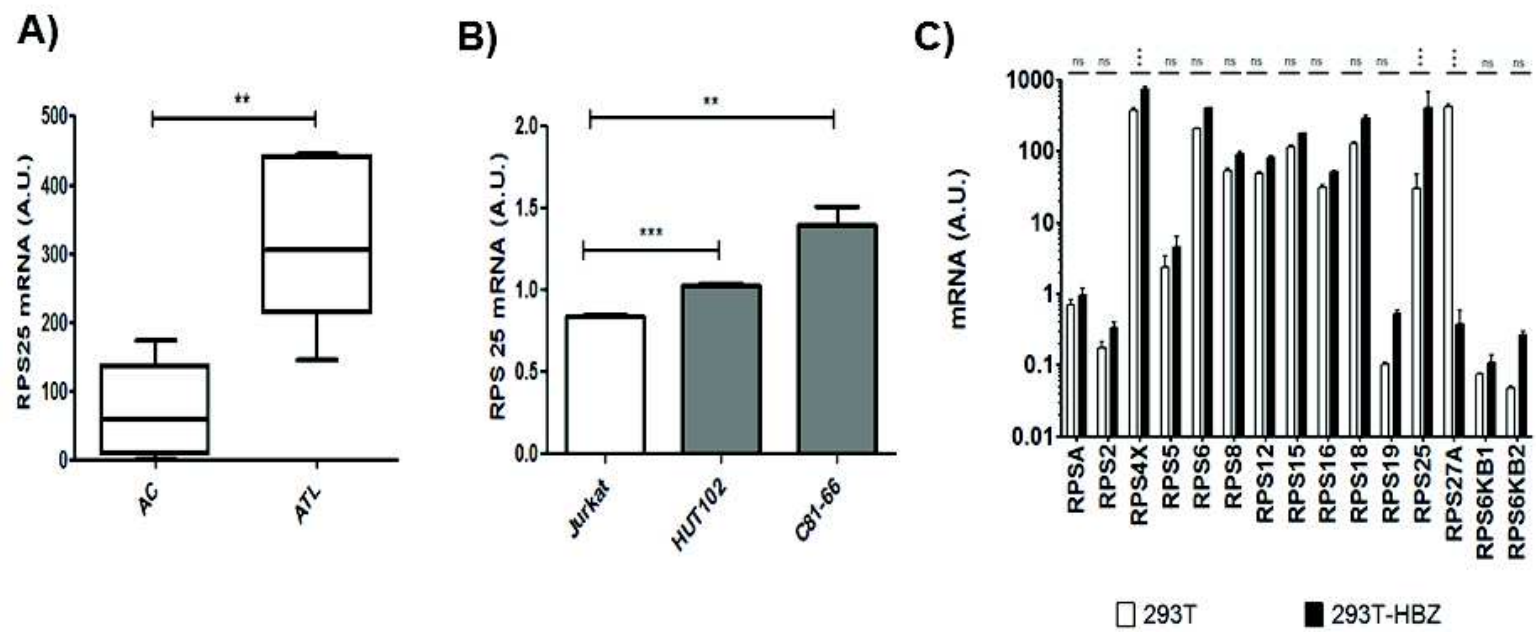


Figure 5

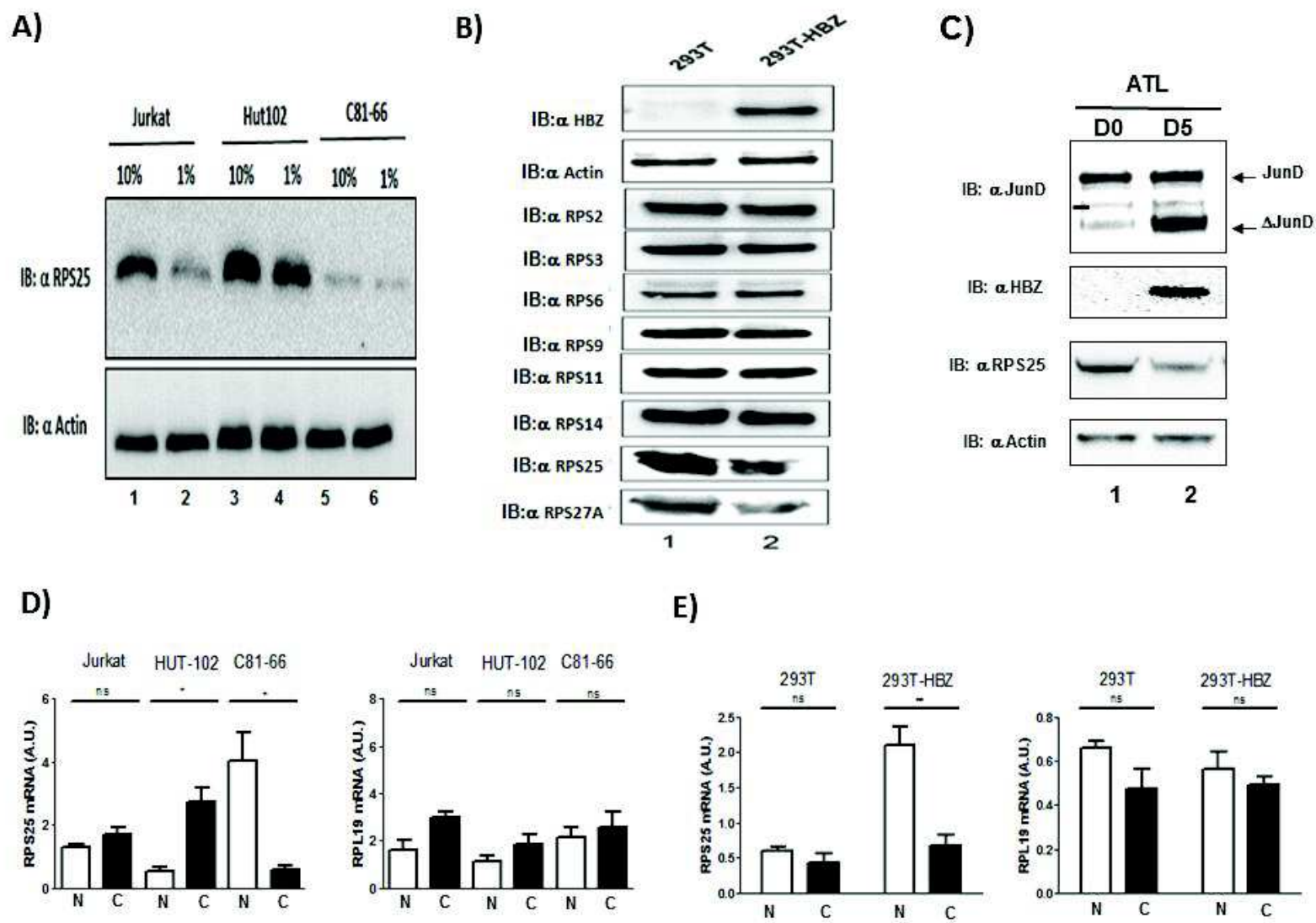
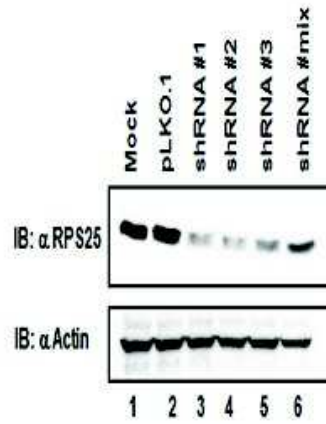
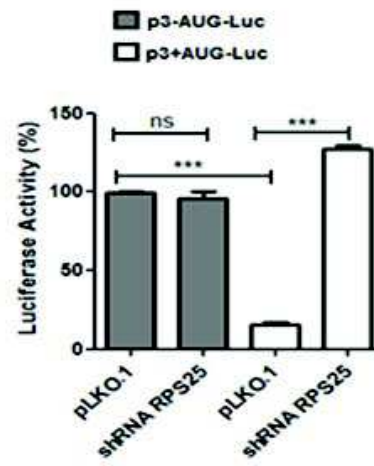


Figure 6

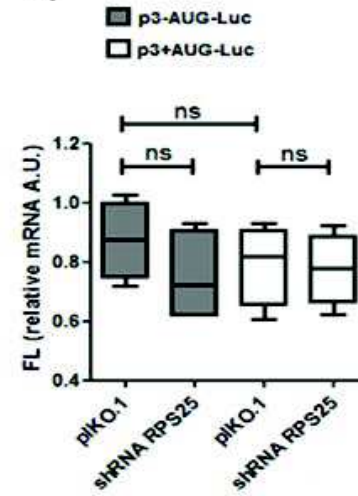
A)



B)



C)



D)

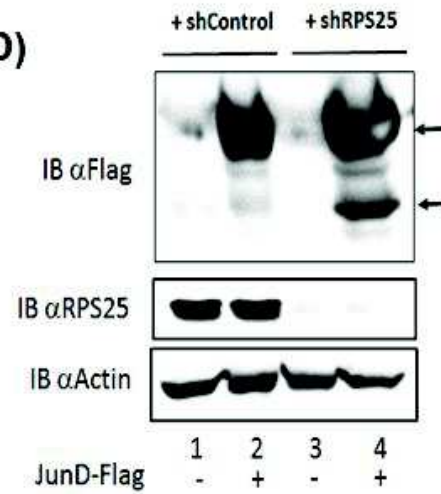


Figure 7

III. Discussion

Il a récemment été rapporté que la protéine HBZ du HTLV-1 stimule l'expression du suppresseur de tumeur JunD et que, paradoxalement, son expression est nécessaire à la prolifération et à la transformation cellulaire induite par *hbz* (Gazon et al., 2012). Dans la présente étude, nous avons découvert que la protéine HBZ induit également l'expression de Δ JunD, une isoforme courte de JunD au rôle potentiellement oncogène du fait de l'absence de domaine d'interaction avec la ménine. Nos résultats indiquent que, contrairement à JunD seul, Δ JunD promeut la prolifération et la transformation cellulaire en l'absence de sérum. L'induction de l'expression de Δ JunD par HBZ pourrait donc contribuer à l'évolution des cellules T infectées en cellules leucémiques.

La transcription du gène *junD* étant à l'origine d'un ARNm dépourvu d'intron, la synthèse de plusieurs isoformes protéiques est le résultat de l'utilisation de codons initiateurs alternatifs. L'initiation de la traduction de Δ JunD se fait à partir du 2^{ème} codon AUG, en phase avec le premier AUG responsable de l'expression de JunD (Figure 13). Cependant, nous avons pu montrer que la présence d'un court ORF en amont de l'AUG de Δ JunD (uORF pour « upstream ORF ») empêche la traduction de Δ JunD. Au contraire, HBZ permet de lever l'inhibition exercée par l'uORF et d'induire l'expression de Δ JunD, en plus de celle de JunD.

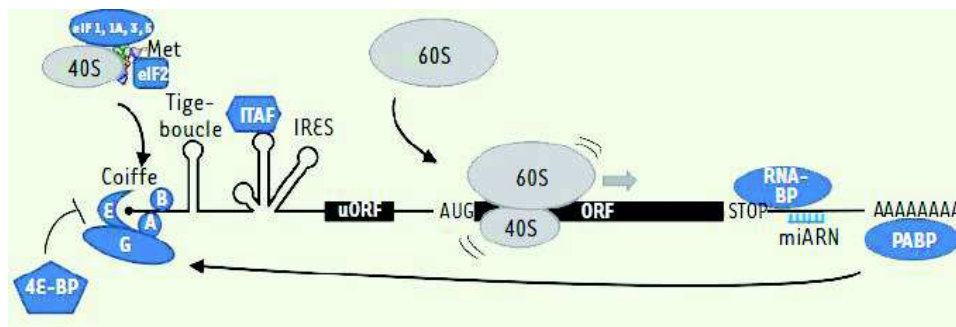


Figure 14 : Modalités d'initiation de la traduction (extrait de Marcel et al., 2014). Les différentes structures codantes et cis-régulatrices d'un ARNm sont représentées en noir. Les éléments trans-régulateurs sont en bleu et les sous-unités 40S et 60S du ribosome sont en gris. eIF, eukaryotic initiation factor ; ITAF, IRES trans-acting factors ; RNA-BP, RNA-binding proteins ; PABP, polyA binding proteins.

En général, l'initiation de la traduction implique la reconnaissance de la coiffe, présente à l'extrémité 5' de l'ARNm, par la sous-unité 40S du ribosome (Figure 14) (Marcel et al., 2014). S'en suit le balayage de la région 5'UTR du messenger et le recrutement de la sous-unité 60S au niveau de l'AUG initiateur. Lors du balayage du messenger, il est possible que le ribosome rencontre une structure secondaire de type IRES (internal ribosome entry site) ou bien une uORF, avec un uAUG et un codon stop (Barbosa et al., 2013; López-Lastra et al., 2005). Ces éléments régulent alors négativement l'initiation de la traduction à partir d'un AUG présent en aval. Par contre, en conditions de stress (*ie.* absence de nutriments ou infection virale), l'IRES permet le recrutement des ribosomes et l'initiation de la traduction plus en aval, de manière indépendante de la coiffe. Dans le cadre d'une uORF, la sous-unité 40S du ribosome reconnaît toujours la coiffe et balaye le messenger. Cependant, elle peut contourner l'uORF (on parle de « ribosome shunting ») ou passer au travers (« leaky scanning »), et aller initier la traduction au niveau d'un AUG présent en aval de l'uORF.

Short and Pfaar ont montré que l'initiation de la traduction de *junD* se fait de manière dépendante de la coiffe et ne contient pas d'IRES (Short and Pfarr, 2002). Aussi, la production de Δ JunD en présence d'HBZ serait le résultat de l'activation des mécanismes de « ribosome shunting » ou de « leaky skanning ». Elle impliquerait une protéine de la sous-unité 40S du ribosome, RPS25, qui a été décrite comme jouant un rôle dans la reconnaissance de l'AUG initiateur (Hertz et al., 2012). En présence d'HBZ, nous avons observé la rétention de l'ARNm de *RPS25* dans le noyau et la diminution de son expression au niveau protéique. De plus, la répression de l'expression de *RPS25* par le biais de shRNA (short-hairpin RNA) suffit à induire la production de Δ JunD dans des cellules HEK293T. Ainsi, en régulant négativement l'expression de *RPS25*, HBZ permettrait de lever l'inhibition exercée par l'uORF et autoriserait la reconnaissance de l'AUG de Δ JunD et sa traduction.

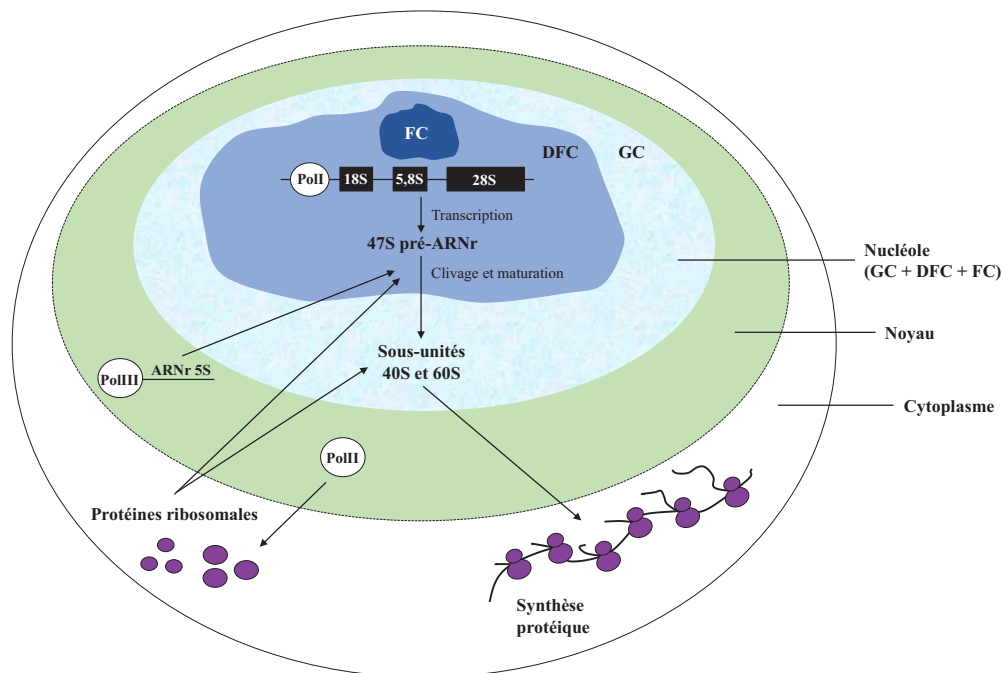


Figure 15 : Modélisation de la biogenèse des ribosomes dans le nucléole (adapté de James et al., 2014 ; Wang et al., 2015). Le nucléole est divisé en 3 zones : FC (fibrillar center), DFC (dense fibrillar component), et GC (granular component). Au niveau de la bordure entre FC et DFC, l'ARN pol I (Pol I) est responsable de la transcription d'un unique ARN polycistronique, le pré-ARNr 47S. Dans le noyau, l'ARNr 5S est issu de la transcription par Pol III. Les gènes codant pour les protéines ribosomales sont également transcrits dans le noyau, mais par Pol II, puis traduits en protéines ribosomales dans le cytoplasme. Ces dernières sont ensuite importées dans le nucléole, où elles participent au clivage et à la maturation du pré-ARNr 47S. Ainsi, la biogenèse des sous-unités 40S et 60S du ribosome débute dans la DFC et se poursuit dans la GC.

Le ribosome humain est constitué de 4 ARNr (ARN ribosomique) et de 80 protéines ribosomales (RPs). Les gènes RPs sont transcrits dans le noyau par PolII, exportés vers le cytoplasme pour y être traduits puis, immédiatement après synthèse, importés vers le nucléole pour y participer à la biogenèse des ribosomes (Figure 15) (James et al., 2014; Wang et al., 2015). L'altération de la composition, et donc de la fonction, des ribosomes a été associée à une susceptibilité accrue au cancer. La protéine HBZ étant localisée dans le nucléole lorsqu'elle n'interagit pas avec des facteurs de type bZIP, nous avons voulu établir la localisation subcellulaire d'HBZ en présence de RPS25 par microscopie confocale (Hivin et al., 2005; Murata et al., 2006). Nos résultats montrent que HBZ et RPS25 co-localisent dans le noyau de cellules COS7 (Figure 16). De plus, le marquage de Ki67 endogène indique que cette co-localisation pourrait plus précisément avoir lieu au niveau de la zone DFC du nucléole (Kill, 1996) (Figure 15). Outre la séquestration du messenger de *RPS25*, il est possible que la protéine HBZ affecte la composition des ribosomes en RPS25 en interférant avec le processus de

biogenèse des ribosomes dans le nucléole. Des expériences de « ribosome profiling » permettraient de vérifier la validité de cette hypothèse.

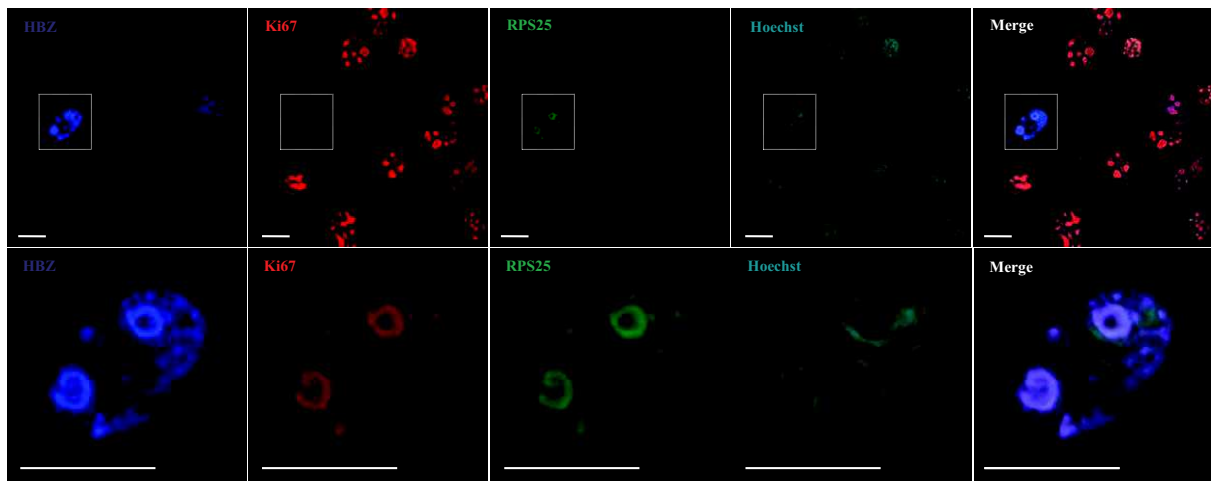


Figure 16 : Co-localisation de RPS25 et HBZ dans le nucléole. Des cellules COS7 ont été transfectées avec HBZ-Myc et RPS25-HA. Après fixation à la formaline et perméabilisation au Triton X100, HBZ a été visualisé à l'aide d'un anticorps anti-c-Myc de lapin et d'un anticorps secondaire d'âne, anti-lapin, couplé à Cy5. RPS25 a été marqué par un anticorps anti-HA de chèvre et un anticorps secondaire d'âne, anti-chèvre, couplé à FITC. Ki67 endogène a été mis en évidence grâce à un anticorps anti-Ki67 de souris et un anticorps secondaire d'âne, anti-souris, couplé à TRITC. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les barres blanches indiquent 10 μ m. Le panel du bas correspond à un zoom effectué au niveau du cadre blanc en pointillés (panel du haut).

CONCLUSION

Depuis sa découverte en 2002, la protéine HBZ du HTLV-1 s'est avérée essentielle au développement et au maintien de l'ATL. En effet, contrairement à Tax et aux autres facteurs viraux, son expression est constitutive dans les cellules ATL et intervient très tôt après l'infection. De plus, HBZ est capable de stimuler l'acquisition de la plupart des caractéristiques de cellules cancéreuses identifiées à ce jour : résistance à l'apoptose, immortalité répliquative, prolifération accrue, inflammation, instabilité génétique, évasion de la surveillance immunitaire et de l'activité des suppresseurs de tumeur (Hanahan and Weinberg, 2011; Ma et al., 2016). Cependant, les modalités de son action restent encore à éclaircir. Les présents travaux de thèse ont permis de mettre en évidence deux mécanismes par lesquels HBZ induirait la survie et la prolifération des cellules ATL.

Dans un premier temps, il a été démontré que la protéine HBZ active une boucle autocrine et/ou paracrine, entre la neurotrophine BDNF et son récepteur de haute affinité TrkB, qui promeut la survie des cellules T infectées par HTLV-1. En effet, HBZ stimule la transcription à partir du promoteur de l'exon IV de *BDNF*. Toutefois, nos résultats suggèrent qu'HBZ activerait indirectement ce promoteur en interagissant avec un facteur de type bZIP. Étant donné l'importance du complexe HBZ/JunD/Sp1 dans l'infection par HTLV-1, aussi bien pour la régulation de l'expression du gène *hbz* que de gènes cellulaires comme *hTERT*, il ne serait pas surprenant que JunD et Sp1 coopèrent avec HBZ pour activer la transcription de *BDNF*. D'autre part, la voie de signalisation BDNF/TrkB joue un rôle central dans la survie et la chimiorésistance de certains types de cellules tumorales et leucémiques, souvent *via* l'inactivation de la kinase GSK3- β (Li et al., 2009b; Thiele et al., 2009). Nos résultats indiquent que la voie BDNF/TrkB stimule la survie des cellules infectées par HTLV-1 et conduit à l'inactivation de GSK3- β . Aussi, il serait intéressant de tester des inhibiteurs spécifiques de la voie BDNF/TrkB dans le traitement des patients ATL, dans le but d'améliorer leurs chances de survie et de rémission.

Dans un deuxième temps, nous avons découvert qu'HBZ dérégule l'expression du suppresseur de tumeur JunD dans les cellules T infectées, et induit celle de l'isoforme potentiellement oncogène Δ JunD. Nos résultats montrent que Δ JunD promeut effectivement la prolifération et la transformation cellulaire, en l'absence de sérum, et nous proposons que son expression contribue à l'évolution des cellules T infectées en cellules leucémiques. D'autre part, nous avons étudié les modalités d'expression de l'isoforme Δ JunD. Nos résultats indiquent que la production de Δ JunD, en présence d'HBZ, implique une protéine de la sous-unité 40S du ribosome : RPS25. En effet, en diminuant l'expression de *RPS25*, HBZ autorise l'initiation de la traduction au niveau de l'AUG de Δ JunD. Cependant, il est possible que RPS25 ne soit pas le seul composant de la machinerie traductionnelle à être ciblé par HBZ. Des résultats préliminaires, obtenus en microscopie confocale, montrent qu'HBZ co-localise avec RPS25 dans le nucléole. Ceci suggère qu'HBZ pourrait déréguler la biogenèse des ribosomes dans le nucléole. L'étude de la composition des ribosomes dans les cellules infectées par HTLV-1 permettrait d'évaluer l'ampleur de l'altération de la machinerie traductionnelle par HBZ.

Il faut savoir qu'HTLV-1 n'est pas le seul rétrovirus humain dont le génome proviral code pour une protéine antisens. Ainsi, l'expression de la protéine ASP (antisens protein) a été détectée chez les patients infectés par le lentivirus HIV-1 (Vanhée-Brossollet et al., 1995). Bien que la fonction d'ASP demeure inconnue à ce jour, il a été proposé qu'elle jouerait un rôle dans l'établissement d'une infection chronique *in vivo* (Barbeau and Mesnard, 2015). Les rétrovirus HTLV-2, HTLV-3, et HTLV-4 expriment également des protéines antisens, nommées respectivement APH-2, -3, et -4 (antisens protein of HTLV) (Halin et al., 2009; Larocque et al., 2011). HTLV-3 et HTLV-4 sont apparemment non pathogènes. Quant au virus HTLV-2, dont

la séquence nucléotidique est fortement homologue à celle de HTLV-1, il est rarement pathogène et n'induit pas de leucémie (Feuer and Green, 2005).

APH-2 est exclusivement présente dans le noyau et produite à partir d'un ARNm épissé et polyadénylé (Halin et al., 2009). Contrairement à HBZ, APH-2 ne possède pas de domaine d'activation, ni de domaine bZIP canonique, et n'interagit pas avec p300/CBP. Par contre, le motif LXXLL est conservé et requis pour son association à CREB. APH-2 est donc capable d'inhiber la trans-activation du LTR5' par Tax, mais de manière moins efficace qu'HBZ (Halin et al., 2009; Yin et al., 2012). D'autre part, *via* son domaine de type bZIP, APH-2 interagit avec c-Jun et JunB, dont elle augmente l'activité transcriptionnelle, mais pas avec JunD (Marban et al., 2012). Grâce à sa partie C-terminale, APH-2 interagit avec l'homologue de Tax, Tax-2, et régule négativement l'activation de la voie AP-1 par Tax-2. Enfin, la protéine antisens du HTLV-2 est moins stable que la protéine HBZ, diminue légèrement l'activité trans-activatrice du facteur p65 de la voie canonique NF- κ B, et n'active pas la voie de signalisation TGF- β (Panfil et al., 2016).

Il n'est donc pas surprenant qu'APH-2 soit incapable d'induire l'immortalisation et la prolifération cellulaire (Douceiron et al., 2012; Yin et al., 2012). Il a également été montré, qu'à l'inverse d'HBZ, APH-2 n'est pas nécessaire à la persistance de l'infection virale *in vivo* (Yin et al., 2012). APH-2 et HBZ semblent donc avoir des propriétés biologiques distinctes qui pourraient expliquer pourquoi HTLV-1 est capable d'induire le développement de l'ATL et non HTLV-2.

Étant donné les différences dans la régulation et le profil d'expression des protéines antisens, par rapport aux autres protéines rétrovirales, leur découverte représente un tournant quant à la compréhension de la pathogenèse induite par les rétrovirus humains.

ANNEXE

Matériels et méthodes pour l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine HBZ en présence de RPS25

Cellules. Les cellules COS7 ont été cultivées dans du milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine (Eurobio, Paris, France).

Transfection. 24 heures avant transfection, dans une plaque 12 puits, une lamelle stérile de 14 mm de diamètre puis 0.8×10^5 cellules COS7 ont été déposées par puits. Le lendemain, la transfection a été réalisée à l'aide du réactif Jet Pei, selon le protocole du fabricant (Polyplus transfection, Illkirch France). Les détails de transfection figurent dans le tableau 2. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30h à 37°C avec 5% de CO₂, avant d'être fixées pour immunofluorescence.

Fixation, immunofluorescence, et préparation pour microscopie. Brièvement, les cellules ont été lavées une fois dans du PBS 1X puis fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution contenant 4% de formaldéhyde (Formalin solution, neutral buffered, 10%, Sigma-Aldrich). Après un lavage au PBS 1X, la fixation des cellules a été stabilisée 5 minutes dans une solution de NH₄Cl à 50 mM. Les cellules ont ensuite été lavées une fois dans du PBS 1X et perméabilisées dans du PBS 1X contenant 0,1% de Triton X100 pendant 10 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les lamelles ont été incubées 1h à température ambiante dans une solution de blocage avec 5% de sérum de veau fœtal. Puis, les lamelles ont été incubées 1h à 37°C en chambre humide avec les anticorps primaires (dilués dans la solution de blocage), lavées trois fois avec la solution de blocage, et incubées à nouveau avec les anticorps secondaires pendant 1h à 37°C et à l'obscurité. Après trois lavages, les noyaux des cellules ont été marqués 5 minutes au colorant Hoechst (Sigma-Aldrich). Après lavages, les lamelles ont finalement été montées sur lame de verre sur une goutte de milieu de montage (ProLong Gold antifade reagent, Life Technologies). Les détails d'immunomarquage figurent dans le tableau 2.

Microscopie confocale. Les images ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SPE (objectif : ACS APO, grandissement 63X, ouverture numérique 1.30) et importées dans le logiciel Leica LAS AF Lite.

Tableau 2 : Paramètres de transfection et d'immunomarquage.

Transfection ^a	Plasmides ^b	Anticorps primaires ^c	Anticorps secondaires d'âne ^d
Contrôle	pcDNA3.1-Myc	anti-c-Myc de lapin anti-HA de chèvre	anti-lapin couplé à Cy5 anti-chèvre couplé à FITC anti-souris couplé à TRITC
HBZ-Myc	pcDNA3.1-Myc pcDNA3.1-HBZ-Myc	anti-c-Myc de lapin anti-Ki67 de souris	anti-lapin couplé à Cy5 anti-souris couplé à TRITC
RPS25-HA	pcDNA3.1-Myc pcDNA3.1/Zeo-RPS25-HA	anti-HA de chèvre anti-Ki67 de souris	anti-chèvre couplé à FITC anti-souris couplé à TRITC
HBZ-Myc et RPS25-HA	pcDNA3.1-HBZ-Myc pcDNA3.1/Zeo-RPS25-HA	anti-c-Myc de lapin anti-HA de chèvre anti-Ki67 de souris	anti-lapin couplé à Cy5 anti-chèvre couplé à FITC anti-souris couplé à TRITC

^a Liste des protéines exprimées par transfection dans les cellules COS7.
^b 1 µg de plasmide a été transfecté au total ; dans le cas de deux plasmides, 0.5 µg de chaque a été transfecté.
^c Les anticorps primaires ont été dilués au 1/100^{ème} pour l'anti-c-Myc (C3956, Sigma) et l'anti-Ki67 (clone MIB-1, Dako) et au 1/200^{ème} pour l'anti-HA (A190-107A, Bethyl).
^d Les anticorps secondaires ont été dilués au 1/100^{ème} : anti-lapin et anti-souris (Jackson Immuno Research), et anti-chèvre (Tebu).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal, S.K., Novotny, E.A., Crabtree, J.S., Weitzman, J.B., Yaniv, M., Burns, A.L., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., and Marx, S.J. (2003). Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 10770–10775.

Akil, H., Perraud, A., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2016). Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *22*, 490–500.

Alais, S., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J. Virol.* *89*, 10580–10590.

Andrade, R.G., Gonçalves, P. de C., Ribeiro, M.A., Romanelli, L.C.F., Ribas, J.G., Torres, E.B., Carneiro-Proietti, A.B. de F., Barbosa-Stancioli, E.F., and Martins, M.L. (2013). Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *56*, 135–140.

Andresen, V., Pise-Masison, C.A., Sinha-Datta, U., Bellon, M., Valeri, V., Washington Parks, R., Cecchinato, V., Fukumoto, R., Nicot, C., and Franchini, G. (2011). Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* *118*, 1549–1559.

Anupam, R., Doueiri, R., and Green, P.L. (2013). The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Front. Microbiol.* *4*.

Arnold, J., Yamamoto, B., Li, M., Phipps, A.J., Younis, I., Lairmore, M.D., and Green, P.L. (2006). Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* *107*, 3976–3982.

Arnold, J., Zimmerman, B., Li, M., Lairmore, M.D., and Green, P.L. (2008). Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* *112*, 3788–3797.

Arpin-André, C., Laverdure, S., Barbeau, B., Gross, A., and Mesnard, J.-M. (2014). Construction of a reporter vector for analysis of bidirectional transcriptional activity of retrovirus LTR. *Plasmid* *74*, 45–51.

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*.

Banerjee, P., Feuer, G., and Barker, E. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4⁺ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. *J. Virol.* *81*, 9707–9717.

Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* 26, 89–98.

Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2011). Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses* 3, 456–468.

Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2015). Does chronic infection in retroviruses have a sense? *Trends Microbiol.* 23, 367–375.

Barbosa, C., Peixeiro, I., and Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLOS Genet* 9, e1003529.

Barnhart, M.K., Connor, L.M., and Marriott, S.J. (1997). Function of the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats in basal transcription. *J. Virol.* 71, 337–344.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2003). The HBZ Factor of Human T-cell Leukemia Virus Type I Dimerizes with Transcription Factors JunB and c-Jun and Modulates Their Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* 278, 43620–43627.

Beishline, K., and Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS J.* 282, 224–258.

Bellon, M., Baydoun, H.H., Yao, Y., and Nicot, C. (2010). HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* 115, 2441–2448.

Belrose, G., Gross, A., Olindo, S., Lézin, A., Dueymes, M., Komla-Soukha, I., Smadja, D., Tanaka, Y., Willems, L., Mesnard, J.-M., et al. (2011). Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood* 118, 2483–2491.

Biasiotto, R., Aguiari, P., Rizzuto, R., Pinton, P., D’Agostino, D.M., and Ciminale, V. (2010). The p13 protein of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) modulates mitochondrial membrane potential and calcium uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 945–951.

Bittencourt, A.L., and de Oliveira, M. de F.P. (2010). Cutaneous manifestations associated with HTLV-1 infection. *Int. J. Dermatol.* 49, 1099–1110.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., et al. (2009). A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321–322.

Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Straif, K., Group, W.I.A. for R. on C.M.W., and others (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol.* 13, 339–340.

Boxus, M., and Willems, L. (2012). How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells. *Retrovirology* 9, 1–5.

Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5, 76.

Carpentier, A., Barez, P.-Y., Hamaidia, M., Gazon, H., de Brogniez, A., Perike, S., Gillet, N., and Willems, L. (2015). Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. *Viruses* 7, 3603–3624.

Cavanagh, M.-H., Landry, S., Audet, B., Arpin-André, C., Hivin, P., Paré, M.-E., Thête, J., Wattel, E., Marriott, S.J., Mesnard, J.-M., et al. (2006). HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* 3, 15.

Ceccaldi, P.-E., Delebecque, F., Prevost, M.-C., Moris, A., Abastado, J.-P., Gessain, A., Schwartz, O., and Ozden, S. (2006). DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 80, 4771–4780.

Ciminale, V., Zotti, L., D'Agostino, D.M., Ferro, T., Casareto, L., Franchini, G., Bernardi, P., and Chieco-Bianchi, L. (1999). Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Oncogene* 18, 4505–4514.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.-A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

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.

Clerc, I., Hivin, P., Rubbo, P.-A., Lemasson, I., Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2009). Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology* 391, 195–202.

Coffin, J.M. (2015). The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15525–15529.

Cole, A.R. (2012). GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. *Front. Mol. Neurosci.* 5.

Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Feroni, 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.

Cook, L.B.M., Melamed, A., Demontis, M.A., Laydon, D.J., Fox, J.M., Tosswill, J.H.C., de Freitas, D., Price, A.D., Medcalf, J.F., Martin, F., et al. (2016). Rapid dissemination of human T-lymphotropic virus type 1 during primary infection in transplant recipients. *Retrovirology* 13.

Cook, P.R., Polakowski, N., and Lemasson, I. (2011). HTLV-1 HBZ Protein Deregulates Interactions between Cellular Factors and the KIX Domain of p300/CBP. *J. Mol. Biol.* *409*, 384–398.

Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626–635.

Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., and Kashanchi, F. (2012). HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways. *Front. Microbiol.* *3*.

D'Agostino, D.M., Ranzato, L., Arrigoni, G., Cavallari, I., Belleudi, F., Torrisi, M.R., Silic-Benussi, M., Ferro, T., Petronilli, V., Marin, O., et al. (2002). Mitochondrial alterations induced by the p13II protein of human T-cell leukemia virus type 1. Critical role of arginine residues. *J. Biol. Chem.* *277*, 34424–34433.

D'Agostino, D.M., Silic-Benussi, M., Hiramagi, H., Lairmore, M.D., and Ciminale, V. (2005). The human T-cell leukemia virus type 1 p13II protein: effects on mitochondrial function and cell growth. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 1*, 905–915.

Datta, A., Sinha-Datta, U., Dhillon, N.K., Buch, S., and Nicot, C. (2006). The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *J. Biol. Chem.* *281*, 23414–23424.

De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* *13*, 607–615.

Derse, D., Heidecker, G., Mitchell, M., Hill, S., Lloyd, P., and Princler, G. (2004). Infectious transmission and replication of human T-cell leukemia virus type 1. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *9*, 2495–2499.

Ding, Y., Shen, S., Lino, A.C., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2008). Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat. Med.* *14*, 162–169.

Dissinger, N., Shkriabai, N., Hess, S., Al-Saleem, J., Kvaratskhelia, M., and Green, P.L. (2014). Identification and characterization of HTLV-1 HBZ post-translational modifications. *PloS One* *9*, e112762.

Dodon, M.D., Hamaia, S., Martin, J., and Gazzolo, L. (2002). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 interferes with the binding of the human T cell leukemia virus type 1 regulatory protein to its response element. *J. Biol. Chem.* *277*, 18744–18752.

Douceron, E., Kaidarova, Z., Miyazato, P., Matsuoka, M., Murphy, E.L., and Mahieux, R. (2012). HTLV-2 APH-2 Expression Is Correlated With Proviral Load but APH-2 Does Not Promote Lymphocytosis. *J. Infect. Dis.* *205*, 82–86.

Downey, R.F., Sullivan, F.J., Wang-Johanning, F., Ambs, S., Giles, F.J., and Glynn, S.A. (2015). Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice?: HERV-K activation in cancer and impact on tumor biology. *Int. J. Cancer* *137*, 1249–1257.

Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859–868.

Fan, J., Ma, G., Nosaka, K., Tanabe, J., Satou, Y., Koito, A., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.-P., and Matsuoka, M. (2010). APOBEC3G Generates Nonsense Mutations in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes In Vivo. *J. Virol.* 84, 7278–7287.

Fenner, B.M. (2012). Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 15–24.

Feuer, G., and Green, P.L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5996–6004.

Fukumoto, R., Dunder, M., Nicot, C., Adams, A., Valeri, V.W., Samelson, L.E., and Franchini, G. (2007). Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(I) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *J. Virol.* 81, 9088–9099.

Furukawa, Y., Kubota, R., Tara, M., Izumo, S., and Osame, M. (2001). Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 97, 987–993.

Gabet, A.S., Mortreux, F., Talarmin, A., Plumelle, Y., Leclercq, I., Leroy, A., Gessain, A., Clity, E., Joubert, M., and Wattel, E. (2000). High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene* 19, 4954–4960.

Gallo, R.C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* 2, 17.

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.

Gazon, H., Lemasson, I., Polakowski, N., Césaire, R., Matsuoka, M., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Peloponese, J.-M. (2012). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) bZIP Factor Requires Cellular Transcription Factor JunD To Upregulate HTLV-1 Antisense Transcription from the 3' Long Terminal Repeat. *J. Virol.* 86, 9070–9078.

Gazon, H., Belrose, G., Terol, M., Meniane, J.-C., Mesnard, J.-M., Césaire, R., and Peloponese, J.-M. (2016). Impaired expression of DICER and some microRNAs in HBZ expressing cells from acute adult T-cell leukemia patients. *Oncotarget* 5.

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

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., Saal, F., Gout, O., Daniel, M.T., Flandrin, G., de The, G., Peries, J., and Sigaux, F. (1990). High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. *Blood* 75, 428–433.

Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.* 66, 2288–2295.

Grassmann, R., Dengler, C., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., McGuire, K., Dokhelar, M.C., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3351–3355.

Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K.-T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24, 5976–5985.

Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New Insights in the Biology of BDNF Synthesis and Release: Implications in CNS Function. *J. Neurosci.* 29, 12764–12767.

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

Gupta, V.K., You, Y., Gupta, V.B., Klistorner, A., and Graham, S.L. (2013). TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10122–10142.

Hagiya, K., Yasunaga, J.-I., Satou, Y., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2011). ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 8, 19.

Halin, M., Douceron, E., Clerc, I., Journo, C., Ko, N.L., Landry, S., Murphy, E.L., Gessain, A., Lemasson, I., Mesnard, J.-M., et al. (2009). Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. *Blood* 114, 2427–2438.

Hall, W.W., and Fujii, M. (2005). Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24, 5965–5975.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hanon, E., Hall, S., Taylor, G.P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J.N., and Bangham, C.R. (2000). Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95, 1386–1392.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26, 203–234.

Hempstead, B.L. (2015). Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 126, 9–19.

Henning, Ellsworth, R., Valente, A., Schroeder, B., and Shriver, C. (2015). Chronic Inflammation in Cancer: The Role of Human Viruses. *Adv. Tumor Virol.* 1.

Hernandez, J.M., Floyd, D.H., Weilbaeher, K.N., Green, P.L., and Boris-Lawrie, K. (2008). Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene* 27, 4757–4767.

Hertz, M.I., Landry, D.M., Willis, A.E., Luo, G., and Thompson, S.R. (2012). Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse IRESs and ribosome shunting. *Mol. Cell. Biol.* MCB.00879-12.

Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* 117, 5965–5973.

Hilburn, S., Rowan, A., Demontis, M.-A., MacNamara, A., Asquith, B., Bangham, C.R.M., and Taylor, G.P. (2011). In vivo expression of human T-lymphotropic virus type 1 basic leucine-zipper protein generates specific CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocyte responses that correlate with clinical outcome. *J. Infect. Dis.* 203, 529–536.

Hino, S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87, 152–166.

Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K.-I., Shirakawa, S., and Miyoshi, I. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6476–6480.

Hiraragi, H., Michael, B., Nair, A., Silic-Benussi, M., Ciminale, V., and Lairmore, M. (2005). Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13II sensitizes Jurkat T cells to Ras-mediated apoptosis. *J. Virol.* 79, 9449–9457.

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

Hivin, P., Frédéric, M., Arpin-André, C., Basbous, J., Gay, B., Thébault, S., and Mesnard, J.-M. (2005). Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J. Cell Sci.* 118, 1355–1362.

Hivin, P., Basbous, J., Raymond, F., Henaff, D., Arpin-André, C., Robert-Hebmann, V., Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2007). The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology* 4, 14.

Ho, Y.-K., Zhi, H., DeBiaso, D., Philip, S., Shih, H.-M., and Giam, C.-Z. (2012). HTLV-1 tax-induced rapid senescence is driven by the transcriptional activity of NF-κB and depends on chronically activated IKKα and p65/RelA. *J. Virol.* 86, 9474–9483.

Hollingworth, R., and Grand, R. (2015). Modulation of DNA Damage and Repair Pathways by Human Tumour Viruses. *Viruses* 7, 2542–2591.

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.

Ilyinskaya, A., Derse, D., Hill, S., Princler, G., and Heidecker, G. (2013). Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology* 436, 201–209.

Inaba, S., Sato, H., Okochi, K., Fukada, K., Takakura, F., Tokunaga, K., Kiyokawa, H., and Maeda, Y. (1989). Prevention of transmission of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) through transfusion, by donor screening with antibody to the virus. One-year experience. *Transfusion (Paris)* 29, 7–11.

International Agency for Research on Cancer and Cancer Research UK (2014). World Cancer Factsheet. Cancer Res. UK Lond.

Isono, O., Ohshima, T., Saeki, Y., Matsumoto, J., Hijikata, M., Tanaka, K., and Shimotohno, K. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 283, 34273–34282.

Iwanaga, M., Watanabe, T., and Yamaguchi, K. (2012). Adult T-Cell Leukemia: A Review of Epidemiological Evidence. *Front. Microbiol.* 3.

Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J. Virol.* 83, 10908–10921.

James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R., and DiMario, P. (2014). Nucleolar stress with and without p53. *Nucl. Austin Tex* 5, 402–426.

Jeong, S.-J., Dasgupta, A., Jung, K.-J., Um, J.-H., Burke, A., Park, H.U., and Brady, J.N. (2008). PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells. *Virology* 370, 264–272.

Johnson, J.M., Nicot, C., Fullen, J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J.C., Jacobson, S., and Franchini, G. (2001). Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J. Virol.* 75, 6086–6094.

Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* 14, 429–436.

Jones, K.S., Lambert, S., Bouttier, M., Bénit, L., Ruscetti, F.W., Hermine, O., and Pique, C. (2011). Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 3, 794–810.

Karube, K., Ohshima, K., Tsuchiya, T., Yamaguchi, T., Kawano, R., Suzumiya, J., Utsunomiya, A., Harada, M., and Kikuchi, M. (2004). Expression of FoxP3, a key molecule in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* 126, 81–84.

Kashanchi, F., and Brady, J.N. (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* 24, 5938–5951.

Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, 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.*

Kato, K., and Akashi, K. (2015). Recent Advances in Therapeutic Approaches for Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Viruses* 7, 6604–6612.

Kawatsuki, A., Yasunaga, J.-., Mitobe, Y., Green, P.L., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4⁺ T cells. *Oncogene.*

Kazanji, M., Ureta-Vidal, A., Ozden, S., Tangy, F., de Thoisy, B., Fiette, L., Talarmin, A., Gessain, A., and de Thé, G. (2000). Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. *J. Virol.* 74, 4860–4867.

Kerschensteiner, M., Stadelmann, C., Dechant, G., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2003). Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann. Neurol.* 53, 292–304.

Kfoury, Y., Nasr, R., Journo, C., Mahieux, R., Pique, C., and Bazarbachi, A. (2012). The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- κ B activation. *Adv. Cancer Res.* 113, 85–120.

Kill, I.R. (1996). Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J. Cell Sci.* 109, 1253–1263.

Kira, J., Koyanagi, Y., Yamada, T., Itoyama, Y., Goto, I., Yamamoto, N., Sasaki, H., and Sakaki, Y. (1991). Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. *Ann. Neurol.* 29, 194–201.

Koiwa, T., Hamano-Usami, A., Ishida, T., Okayama, A., Yamaguchi, K., Kamihira, S., and Watanabe, T. (2002). 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 76, 9389–9397.

Koralnik, I.J., Gessain, A., Klotman, M.E., Lo Monaco, A., Berneman, Z.N., and Franchini, G. (1992). Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8813–8817.

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.

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.

Kusano, S., Yoshimitsu, M., Hachiman, M., and Ikeda, M. (2015). I-mfa domain proteins specifically interact with HTLV-1 Tax and repress its transactivating functions. *Virology* 486, 219–227.

Lairmore, M.D., Haines, R., and Anupam, R. (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr. Opin. Virol.* 2, 474–481.

Landry, S., Halin, M., Vargas, A., Lemasson, I., Mesnard, J.-M., and Barbeau, B. (2009). Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J. Virol.* 83, 2048–2054.

Larocca, D., Chao, L.A., Seto, M.H., and Brunck, T.K. (1989). Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1006–1013.

Larocque, É., Halin, M., Landry, S., Marriott, S.J., Switzer, W.M., and Barbeau, B. (2011). Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-Derived Antisense Transcripts Encode Proteins with Similar Tax-Inhibiting Functions but Distinct Subcellular Localization. *J. Virol.* 85, 12673–12685.

Laverdure, S., Polakowski, N., Hoang, K., and Lemasson, I. (2016). Permissive Sense and Antisense Transcription from the 5' and 3' Long Terminal Repeats of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *J. Virol.* 90, 3600–3610.

Lavorgna, A., and Harhaj, E. (2014). Regulation of HTLV-1 Tax Stability, Cellular Trafficking and NF- κ B Activation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Viruses* 6, 3925–3943.

Lee, R., and Schwartz, R.A. (2011). Human T-lymphotropic virus type 1-associated infective dermatitis: a comprehensive review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 64, 152–160.

Lemasson, I., Polakowski, N.J., Laybourn, P.J., and Nyborg, J.K. (2004). Transcription Regulatory Complexes Bind the Human T-Cell Leukemia Virus 5' and 3' Long Terminal Repeats To Control Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6117–6126.

Lemasson, I., Lewis, M.R., Polakowski, N., Hivin, P., Cavanagh, M.-H., Thébault, S., Barbeau, B., Nyborg, J.K., and Mesnard, J.-M. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J. Virol.* 81, 1543–1553.

Li, M., Kesic, M., Yin, H., Yu, L., and Green, P.L. (2009a). Kinetic Analysis of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gene Expression in Cell Culture and Infected Animals. *J. Virol.* 83, 3788–3797.

Li, M., Kannian, P., Yin, H., Kesic, M., and Green, P.L. (2012). Human T lymphotropic virus type 1 regulatory and accessory gene transcript expression and export are not rex dependent. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 405–410.

Li, Z., Beutel, G., Rhein, M., Meyer, J., Koenecke, C., Neumann, T., Yang, M., Krauter, J., von Neuhoff, N., Heuser, M., et al. (2009b). High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 113, 2028–2037.

Lin, Z., and Flemington, E.K. (2011). miRNAs in the pathogenesis of oncogenic human viruses. *Cancer Lett.* 305, 186–199.

López-Lastra, M., Rivas, A., and Barría, M.I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.* 38, 121–146.

Ma, G., Yasunaga, J., Fan, J., Yanagawa, S., and Matsuoka, M. (2013a). HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene* 32, 4222–4230.

Ma, G., Yasunaga, J., Akari, H., and Matsuoka, M. (2015). TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 2216–2221.

Ma, G., Yasunaga, J.-I., and Matsuoka, M. (2016). Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 13, 16.

Ma, Y., Zheng, S., Wang, Y., Zang, W., Li, M., Wang, N., Li, P., Jin, J., Dong, Z., and Zhao, G. (2013b). The HTLV-1 HBZ protein inhibits cyclin D1 expression through interacting with the cellular transcription factor CREB. *Mol. Biol. Rep.* 40, 5967–5975.

Macaire, H., Riquet, A., Moncollin, V., Biémont-Trescol, M.-C., Duc Dodon, M., Hermine, O., Debaud, A.-L., Mahieux, R., Mesnard, J.-M., Pierre, M., et al. (2012). Tax protein-induced expression of antiapoptotic Bfl-1 protein contributes to survival of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T-cells. *J. Biol. Chem.* 287, 21357–21370.

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.

MacNamara, A., Rowan, A., Hilburn, S., Kadolsky, U., Fujiwara, H., Suemori, K., Yasukawa, M., Taylor, G., Bangham, C.R.M., and Asquith, B. (2010). HLA Class I Binding of HBZ Determines Outcome in HTLV-1 Infection. *PLOS Pathog* 6, e1001117.

Maeda, Y., Terasawa, H., Tanaka, Y., Mitsuura, C., Nakashima, K., Yusa, K., and Harada, S. (2015). Separate Cellular Localizations of Human T-Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1) Env and Glucose Transporter Type 1 (GLUT1) Are Required for HTLV-1 Env-Mediated Fusion and Infection. *J. Virol.* 89, 502–511.

Mahieux, R., and Gessain, A. (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. *Viruses* 3, 1074–1090.

Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Fuller, S.D., and Bangham, C.R.M. (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* 3, e2251.

Marban, C., McCabe, Á., Bukong, T.N., Hall, W.W., and Sheehy, N. (2012). Interplay between the HTLV-2 Tax and APH-2 proteins in the regulation of the AP-1 pathway. *Retrovirology* 9, 98.

Marcel, V., Catez, F., Mertani, H.C., and Diaz, J.-J. (2014). [The ribosome: a new player in tumorigenesis?]. *Médecine Sci.* MS 30, 21–24.

Maroder, M., Bellavia, D., Meco, D., Napolitano, M., Stigliano, A., Alesse, E., Vacca, A., Giannini, G., Frati, L., Gulino, A., et al. (1996). Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J. Immunol.* *157*, 2864–2872.

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

Martin, J., Maldonado, J., Mueller, J., Zhang, W., and Mansky, L. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* *8*, 31.

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. (2010). HTLV-1 bZIP factor gene: Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Mol. Aspects Med.* *31*, 359–366.

Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 270–280.

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

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.

Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog.* *6*, e1000788.

Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., and Filatov, A. (2012). Role of O-glycosylation and expression of CD43 and CD45 on the surfaces of effector T cells in human T cell leukemia virus type 1 cell-to-cell infection. *J. Virol.* *86*, 2447–2458.

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., Laydon, D.J., Al Khatib, H., Rowan, A.G., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2015). HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8⁺ T cells in natural infection. *Retrovirology* *12*.

Mesri, E.A., Feitelson, M.A., and Munger, K. (2014). Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host Microbe* *15*, 266–282.

Michael, B., Nair, A.M., Hilaragi, H., Shen, L., Feuer, G., Boris-Lawrie, K., and Lairmore, M.D. (2004). Human T lymphotropic virus type-1 p30II alters cellular gene expression to selectively enhance signaling pathways that activate T lymphocytes. *Retrovirology* *1*, 39.

Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 850–860.

Mitagami, Y., Yasunaga, J., Kinoshita, H., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2015). Interferon- γ Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. *PLOS Pathog* *11*, e1005120.

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.

Miyazaki, M., Yasunaga, J.-I., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T., and Matsuoka, M. (2007). Preferential Selection of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Provirus Lacking the 5' Long Terminal Repeat during Oncogenesis. *J. Virol.* *81*, 5714–5723.

Miyazato, P., and Matsuoka, M. (2014). Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression: viral strategy in vivo. *Int. Immunol.* *26*, 419–425.

Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K., and Hinuma, Y. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* *294*, 770–771.

Mizuguchi, M., Sasaki, Y., Hara, T., Higuchi, M., Tanaka, Y., Funato, N., Tanaka, N., Fujii, M., and Nakamura, M. (2016). 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.

Moles, R., and Nicot, C. (2015). The Emerging Role of miRNAs in HTLV-1 Infection and ATLL Pathogenesis. *Viruses* *7*, 4047–4074.

Moore, P.S., and Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 878–889.

Mori, N., Fujii, M., Iwai, K., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Hata, T., Yamada, Y., Tanaka, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2000). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* *95*, 3915–3921.

Mortreux, F., Kazanji, M., Gabet, A.S., de Thoisy, B., and Wattel, E. (2001). Two-step nature of human T-cell leukemia virus type 1 replication in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Virol.* *75*, 1083–1089.

Mortreux, F., Gabet, A.-S., and Wattel, E. (2003). Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia* *17*, 26–38.

Mukai, R., and Ohshima, T. (2014). HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. *Oncogene* *33*, 2317–2328.

Murata, K., Hayashibara, T., Sugahara, K., Uemura, A., Yamaguchi, T., Harasawa, H., Hasegawa, H., Tsuruda, K., Okazaki, T., Koji, T., et al. (2006). A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J. Virol.* *80*, 2495–2505.

Murphy, E.L., Hanchard, B., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Lofters, W.S., Campbell, M., Goedert, J.J., and Blattner, W.A. (1989). Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int. J. Cancer* *43*, 250–253.

Murphy, J., Hall, W.W., Ratner, L., and Sheehy, N. (2016). Novel interactions between the HTLV antisense proteins HBZ and APH-2 and the NFAR protein family: Implications for the HTLV lifecycles. *Virology* *494*, 129–142.

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.

Nakano, K., and Watanabe, T. (2016). HTLV-1 Rex Tunes the Cellular Environment Favorable for Viral Replication. *Viruses* *8*, 58.

Nakano, K., Ando, T., Yamagishi, M., Yokoyama, K., Ishida, T., Ohsugi, T., Tanaka, Y., Brighty, D.W., and Watanabe, T. (2013). Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *15*, 491–505.

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

Ohsugi, T. (2013). A transgenic mouse model of human T cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Front. Microbiol.* *4*.

Okochi, K., Sato, H., and Hinuma, Y. (1984). A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.* *46*, 245–253.

Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1031–1032.

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.

Panfil, A.R., Dissinger, N.J., Howard, C.M., Murphy, B.M., Landes, K., Fernandez, S.A., and Green, P.L. (2016). Functional Comparison of HBZ and the Related APH-2 Protein Provides Insight into Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Pathogenesis. *J. Virol.* *90*, 3760–3772.

Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* *118*, 3030–3044.

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., Yeung, M.L., and Jeang, K.-T. (2006). Modulation of nuclear factor-kappaB by human T cell leukemia virus type 1 Tax protein: implications for oncogenesis and inflammation. *Immunol. Res.* *34*, 1–12.

Philip, S., Zahoor, M.A., Zhi, H., Ho, Y.-K., and Giam, C.-Z. (2014). Regulation of Human T-Lymphotropic Virus Type I Latency and Reactivation by HBZ and Rex. *PLoS Pathog.* *10*, e1004040.

Picard, C., Gabert, J., Olive, D., and Collette, Y. (2004). Altered splicing in hematological malignancies reveals a tissue-specific translational block of the Src-family tyrosine kinase fyn brain isoform expression. *Leukemia* *18*, 1737–1739.

Pise-Masison, C.A., de Castro-Amarante, M.F., Enose-Akahata, Y., Buchmann, R.C., Fenizia, C., Washington Parks, R., Edwards, D., Fiocchi, M., Alcantara, L.C., Bialuk, I., et al. (2014). Co-dependence of HTLV-1 p12 and p8 Functions in Virus Persistence. *PLoS Pathog.* *10*, e1004454.

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.* *77*, 7415–7419.

Popovic, M., Reitz, M.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V.S., Nakao, Y., Miyoshi, I., Minowada, J., Yoshida, M., Ito, Y., et al. (1982). The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. *Nature* *300*, 63–66.

Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* *224*, 497–500.

Rende, F., Cavallari, I., Corradin, A., Silic-Benussi, M., Toulza, F., Toffolo, G.M., Tanaka, Y., Jacobson, S., Taylor, G.P., D'Agostino, D.M., et al. (2011). Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* *117*, 4855–4859.

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.

Rizkallah, G., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Transmission intercellulaire de HTLV-1: Des mécanismes loin d'être complètement élucidés. *Médecine/sciences* *31*, 629–637.

Romanelli, M.G., Diani, E., Bergamo, E., Casoli, C., Ciminale, V., Bex, F., and Bertazzoni, U. (2013). Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Front. Microbiol.* *4*.

Romeo, M.M., Ko, B., Kim, J., Brady, R., Heatley, H.C., He, J., Harrod, C.K., Barnett, B., Ratner, L., Lairmore, M.D., et al. (2015). Acetylation of the c-MYC oncoprotein is required

for cooperation with the HTLV-1 p30II accessory protein and the induction of oncogenic cellular transformation by p30II/c-MYC. *Virology* 476, 271–288.

Rosadas, C., and Puccioni-Sohler, M. (2015). HTLV-1 ORF-I Encoded Proteins and the Regulation of Host Immune Response: Viral Induced Dysregulation of Intracellular Signaling. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–7.

Roucoux, D.F., Wang, B., Smith, D., Nass, C.C., Smith, J., Hutching, S.T., Newman, B., Lee, T.-H., Chafets, D.M., Murphy, E.L., et al. (2005). A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J. Infect. Dis.* 191, 1490–1497.

Rowan, A.G., and Bangham, C.R.M. (2012). Is There a Role for HTLV-1-Specific CTL in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma? *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–7.

Rowan, A.G., Suemori, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2014). Cytotoxic T lymphocyte lysis of HTLV-1 infected cells is limited by weak HBZ protein expression, but non-specifically enhanced on induction of Tax expression. *Retrovirology* 11, 116.

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.

Saito, M., Matsuzaki, T., Satou, Y., Yasunaga, J., Saito, K., Arimura, K., Matsuoka, M., and Ohara, Y. (2009). In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6, 19.

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

Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P.L., Ohkura, N., et al. (2011). HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 7, e1001274.

Schottenfeld, D., and Beebe-Dimmer, J. (2015). The cancer burden attributable to biologic agents. *Ann. Epidemiol.* 25, 183–187.

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.

Semmes, O.J., and Jeang, K.-T. (1996). Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J. Virol.* 70, 6347–6357.

Sengupta, S., Jayaraman, P., Chilton, P.M., Casella, C.R., and Mitchell, T.C. (2007). Unrestrained glycogen synthase kinase-3 beta activity leads to activated T cell death and can be inhibited by natural adjuvant. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 6083–6091.

- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20.
- Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Br. J. Haematol.* 79, 428–437.
- Shinagawa, M., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Roy, B.B., Shimizu, A., Hoque, S.A., and Hoshino, H. (2012). Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J. Gen. Virol.* 93, 608–617.
- Shinzato, O., Ikeda, S., Momita, S., Nagata, Y., Kamihira, S., Nakayama, E., and Shiku, H. (1991). Semiquantitative analysis of integrated genomes of human T-lymphotropic virus type I in asymptomatic virus carriers. *Blood* 78, 2082–2088.
- Shirinian, M., Kfoury, Y., Dassouki, Z., El-Hajj, H., and Bazarbachi, A. (2013). Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front. Microbiol.* 4, 231.
- Short, J.D., and Pfarr, C.M. (2002). Translational Regulation of the JunD Messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 277, 32697–32705.
- Sibon, D., Gabet, A.-S., Zandecki, M., Pinatel, C., Thête, J., Delfau-Larue, M.-H., Rabaoui, 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.
- Silic-Benussi, M., Cannizzaro, E., Venerando, A., Cavallari, I., Petronilli, V., La Rocca, N., Marin, O., Chieco-Bianchi, L., Di Lisa, F., D’Agostino, D.M., et al. (2009). Modulation of mitochondrial K(+) permeability and reactive oxygen species production by the p13 protein of human T-cell leukemia virus type 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 947–954.
- Silic-Benussi, M., Marin, O., Biasiotto, R., D’Agostino, D.M., and Ciminale, V. (2010a). Effects of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p13 on mitochondrial K⁺ permeability: A new member of the viroporin family? *FEBS Lett.* 584, 2070–2075.
- Silic-Benussi, M., Cavallari, I., Vajente, N., Vidali, S., Chieco-Bianchi, L., Di Lisa, F., Saggiaro, D., D’Agostino, D.M., and Ciminale, V. (2010b). Redox regulation of T-cell turnover by the p13 protein of human T-cell leukemia virus type 1: distinct effects in primary versus transformed cells. *Blood* 116, 54–62.
- Sinha-Datta, U., Datta, A., Ghorbel, S., Dodon, M.D., and Nicot, C. (2007). Human T-cell lymphotropic virus type I rex and p30 interactions govern the switch between virus latency and replication. *J. Biol. Chem.* 282, 14608–14615.
- Sugata, K., Satou, Y., Yasunaga, J., Hara, H., Ohshima, K., Utsunomiya, A., Mitsuyama, M., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119, 434–444.
- Sugata, K., Yasunaga, J.-I., Mitobe, Y., Miura, M., Miyazato, P., Kohara, M., and Matsuoka, M. (2015). Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. *Blood* 126, 1095–1105.
- Sun, S.-C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol. Rev.* 246, 125–140.

Takahashi, T., Takase, H., Urano, T., Sugita, S., Miyata, K., Miyata, N., and Mochizuki, M. (2000). Clinical features of human T-lymphotropic virus type 1 uveitis: a long-term follow-up. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 8, 235–241.

Takatsuki, K. (2005). Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology* 2, 16.

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

Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88, 3065–3073.

Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1071–1075.

Tanaka-Nakanishi, A., Yasunaga, J., Takai, K., and Matsuoka, M. (2014). HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. *Cancer Res.* 74, 188–200.

Taniguchi, Y., Nosaka, K., Yasunaga, J., Maeda, M., Mueller, N., Okayama, A., and Matsuoka, M. (2005). Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* 2, 64.

Tarasevich, A., Filatov, A., Pichugin, A., and Mazurov, D. (2015). Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virol.* 59, 247–256.

Taylor, G.P., Goon, P., Furukawa, Y., Green, H., Barfield, A., Mosley, A., Nose, H., Babiker, A., Rudge, P., Usuku, K., et al. (2006). Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology* 3, 63.

Taylor, J.M., Ghorbel, S., and Nicot, C. (2009). Genome wide analysis of human genes transcriptionally and post-transcriptionally regulated by the HTLV-I protein p30. *BMC Genomics* 10, 311.

Temin, H.M. (1982). Function of the retrovirus long terminal repeat. *Cell* 28, 3–5.

Thébault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 562, 165–170.

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.

Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5962–5967.

Treviño, A., Parra, P., Bar-Magen, T., Garrido, C., de Mendoza, C., and Soriano, V. (2012). Antiviral effect of raltegravir on HTLV-1 carriers. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 218–221.

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.

Ureta-Vidal, A., Angelin-Duclos, C., Tortevoeye, P., Murphy, E., Lepère, J.F., Buigues, R.P., Jolly, N., Joubert, M., Carles, G., Pouliquen, J.F., et al. (1999). Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int. J. Cancer* *82*, 832–836.

Usui, T., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Murata, K., Hasegawa, H., Yamada, Y., and Kamihira, S. (2008). Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* *5*, 34.

Valeri, V.W., Hryniewicz, A., Andresen, V., Jones, K., Fenizia, C., Bialuk, I., Chung, H.K., Fukumoto, R., Parks, R.W., Ferrari, M.G., et al. (2010). Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* *116*, 3809–3817.

Van Dooren, S., Pybus, O.G., Salemi, M., Liu, H.-F., Goubau, P., Remondegui, C., Talarmin, A., Gotuzzo, E., Alcantara, L.C.J., Galvão-Castro, B., et al. (2004). The low evolutionary rate of human T-cell lymphotropic virus type-1 confirmed by analysis of vertical transmission chains. *Mol. Biol. Evol.* *21*, 603–611.

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

Vanhée-Brossollet, C., Thoreau, H., Serpente, N., D'Auriol, L., Lévy, J.P., and Vaquero, C. (1995). A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology* *206*, 196–202.

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.

Wang, W., Nag, S., Zhang, X., Wang, M.-H., Wang, H., Zhou, J., and Zhang, R. (2015). Ribosomal Proteins and Human Diseases: Pathogenesis, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Implications: RIBOSOMAL PROTEINS AND HUMAN DISEASES. *Med. Res. Rev.* *35*, 225–285.

Watanabe, T., Seiki, M., and Yoshida, M. (1984). HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology* *133*, 238–241.

Wattel, E., Mariotti, M., Agis, F., Gordien, E., Le Coeur, F.F., Prin, L., Rouger, P., Chen, I.S., Wain-Hobson, S., and Lefrere, J.J. (1992). Quantification of HTLV-1 proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, 943–946.

Weil, R., Levraud, J.-P., Dodon, M.D., Bessia, C., Hazan, U., Kourilsky, P., and Israël, A. (1999). Altered expression of tyrosine kinases of the Src and Syk families in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines. *J. Virol.* 73, 3709–3717.

West, A.E., Pruunsild, P., and Timmusk, T. (2014). Neurotrophins: transcription and translation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 67–100.

White, M.K., Pagano, J.S., and Khalili, K. (2014). Viruses and Human Cancers: a Long Road of Discovery of Molecular Paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 463–481.

Wierstra, I. (2008). Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 1–13.

Wilks, R., Hanchard, B., Morgan, O., Williams, E., Cranston, B., Smith, M.L., Rodgers-Johnson, P., and Manns, A. (1996). Patterns of HTLV-I infection among family members of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Int. J. Cancer* 65, 272–273.

Wright, D.G., Marchal, C., Hoang, K., Ankney, J.A., Nguyen, S.T., Rushing, A.W., Polakowski, N., Miotto, B., and Lemasson, I. (2015). Human T-cell leukemia virus type-1-encoded protein HBZ represses p53 function by inhibiting the acetyltransferase activity of p300/CBP and HBO1. *Oncotarget* 7, 1687–1706.

Wurm, T., Wright, D.G., Polakowski, N., Mesnard, J.-M., and Lemasson, I. (2012). The HTLV-1-encoded protein HBZ directly inhibits the acetyl transferase activity of p300/CBP. *Nucleic Acids Res.* 40, 5910–5925.

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- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21, 121–135.

Yamamoto-Taguchi, N., Satou, Y., Miyazato, P., Ohshima, K., Nakagawa, M., Katagiri, K., Kinashi, T., and Matsuoka, M. (2013). HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *PLOS Pathog* 9, e1003630.

Yan, P., Fu, J., Qu, Z., Li, S., Tanaka, T., Grusby, M.J., and Xiao, G. (2009). PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* 113, 4370–4380.

Yashiki, S., Fujiyoshi, T., Arima, N., Osame, M., Yoshinaga, M., Nagata, Y., Tara, M., Nomura, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., et al. (2001). HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1047–1061.

Yasuma, K., Yasunaga, J., Takemoto, K., Sugata, K., Mitobe, Y., Takenouchi, N., Nakagawa, M., Suzuki, Y., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLOS Pathog* 12, e1005372.

Yin, H., Kannian, P., Dissinger, N., Haines, R., Niewiesk, S., and Green, P.L. (2012). Human T-cell leukemia virus type 2 antisense viral protein 2 is dispensable for in vitro immortalization but functions to repress early virus replication in vivo. *J. Virol.* 86, 8412–8421.

Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. *J. Virol.* 82, 9359–9368.

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

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

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

Zhao, T., Coutts, A., Xu, L., Yu, J., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2013). HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBP α signaling. *Retrovirology* 10, 159.

Zhao, T., Satou, Y., and Matsuoka, M. (2014). Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. *Arch. Virol.* 159, 1849–1856.

Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y.-L., Ho, Y.-K., Shih, H.-M., and Giam, C.-Z. (2011). NF- κ B Hyper-Activation by HTLV-1 Tax Induces Cellular Senescence, but Can Be Alleviated by the Viral Anti-Sense Protein HBZ. *PLOS Pathog* 7, e1002025.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Principaux foyers d'infection par HTLV-1.....	19
Figure 2 : Structure et génome du rétrovirus HTLV-1.....	21
Figure 3 : Représentation schématique de la trans-activation du LTR5' par la protéine Tax du HTLV-1	22
Figure 4 : Modélisation de la primo-infection par HTLV-1	27
Figure 5 : Schématisation des domaines structuraux et fonctionnels de la protéine Tax du HTLV-1	30
Figure 6 : Principales modifications post-traductionnelles de la protéine Tax du HTLV-1.	30
Figure 7 : Activation constitutive de la voie NF- κ B par la protéine Tax du HTLV-1	32
Figure 8 : Le génome proviral du HTLV-1 peut être transcrit en sens mais aussi en antisens, selon le stade de l'infection.	37
Figure 9 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine HBZ du HTLV-1 et de leur(s) cible(s) cellulaire(s).....	39
Figure 10 : Représentation schématique du gène et de la protéine BDNF	46
Figure 11 : Les trois principales isoformes du récepteur TrkB et leurs domaines fonctionnels	47
Figure 12 : Schéma illustrant les principales voies de signalisation cellulaire activées par TrkB-TK ⁺	48
Figure 13 : Transcription et traduction du gène humain junD	65
Figure 14 : Modalités d'initiation de la traduction	102
Figure 15 : Modélisation de la biogenèse des ribosomes dans le nucléole	103
Figure 16 : Co-localisation de RPS25 et HBZ dans le nucléole	104
Tableau 1 : Virus oncogènes humains, description et propriétés tumorigènes.....	17
Tableau 2 : Paramètres de transfection et d'immunomarquage.....	109

❖ **Thesis title**

Deciphering the molecular mechanisms responsible for the cellular proliferation induced by the HBZ oncoprotein of the HTLV-1 retrovirus

❖ **Research unit**

CPBS FRE3689 CNRS
1919 route de Mende
34293 Montpellier cedex 5